



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

UNIVERSITÀ DI ROMA
“SAPIENZA”

Scuola di Dottorato in Scienze Mediche Sperimentali e Cliniche

Dottorato di Ricerca in “Medicina Molecolare”

XXIV ciclo

TESI

**Il microRNA let-7c induce differenziamento
granulocitario in cellule di leucemia mieloide acuta**

Andrea Pelosi

Tutor: Prof. Massimo Levrero

Relatore esterno: Dott.ssa Maria Giulia Rizzo

Coordinatore: Prof. Alberto Gulino

A te

INDICE

Abstract	7
Introduzione	9
Capitolo 1. L’ematopoiesi	9
1.1 Cenni generali.....	9
1.2 La mielopoiesi	10
1.3 Meccanismi molecolari del differenziamento ematopoietico.....	12
Capitolo 2. La leucemia mieloide acuta	16
2.1 Le leucemie	16
2.2 La leucemia mieloide acuta: caratteristiche generali.....	16
2.3 La classificazione Franco-Americana-Britannica	17
2.4 Patogenesi molecolare della leucemia mieloide acuta	19
2.4.1 Anomalie citogenetiche nella leucemia mieloide acuta	21
2.4.1.1 <i>La leucemia promielocitica acuta</i>	22
2.4.1.2 <i>Altre aberrazioni cromosomiche comuni</i>	24
2.4.2 Mutazioni geniche	25
2.5 La famiglia di proteine PBX e leucemie	28
2.5.1 Le proteine PBX	28
2.5.2 PBX e geni Hox nella trasformazione leucemica	30
2.5.3 Ruoli Hox-indipendenti delle proteine PBX	31
Capitolo 3. I micro-RNA e le leucemie	33
3.1 I micro-RNA: biogenesi e meccanismi d’azione	33

3.2	Predizione bioinformatica dei bersagli molecolari dei miRNA.....	36
3.3	I microRNA nell’ematopoiesi normale e patologica	39
3.3.1	MicroRNA nell’ematopoiesi normale	39
3.3.2	MicroRNA e leucemie	40
3.4	La famiglia di microRNA let-7	43
3.4.1	Aspetti generali sulla famiglia let-7	43
3.4.2	Let-7 e tumori	45

Obiettivi della ricerca	49
--------------------------------------	-----------

Materiali e Metodi	50
• Linee cellulari e condizioni di coltura	50
• Blasti primari derivati da pazienti	50
• Cellule ematopoietiche normali	50
• Trattamenti	51
• Reagenti di trasfezione	51
• Trasfezioni	52
• Costruzione dei plasmidi lentivirali, prod. di lentivirus e infezione.....	52
• Analisi immunofenotipica	53
• Analisi del ciclo cellulare	53
• Colorazione May Grünwald-Giemsa	53
• Preparazione di RNA e cDNA	54
• Real Time PCR	55
• Predizione bioinformatica dei bersagli di let-7c	56
• Western Blot	57
• Costrutti luc e saggi luciferasici	58
• Analisi statistica	58

Risultati	59
• L’iper-espressione del let-7c induce differenziamento in cellule di leucemia mieloide acuta	59

• L'iper-espressione del let-7c induce differenziamento in cellule di LAM specificamente lungo la linea granulocitaria	62
• L'iper-espressione del let-7c in cellule di LAM non altera la proliferazione	63
• Analisi del ruolo di let-7c nella granulopoiesi normale	64
• Analisi <i>in silico</i> dei putativi bersagli molecolari del let-7c.....	66
• L'espressione delle proteina PBX2 è ridotta in cellule di LAM iper-esprimenti let-7c	68
• Espressione di PBX2 nel differenziamento indotto da ATRA.....	69
• PBX2 è un bersaglio molecolare diretto del let-7c	70
• Il silenziamento di PBX2 favorisce il differenziamento delle NB4 ...	72
 Discussione e conclusioni	 74
 Bibliografia	 78

Abstract

La leucemia mieloide acuta (LAM) rappresenta un gruppo eterogeneo di disordini ematopoietici, caratterizzati da distinte lesioni genetiche. La leucemia promielocitica acuta (LAP) è un peculiare sottotipo di LAM in cui l'arresto della maturazione mieloide si verifica allo stadio di promielocita, ed è causata dall'oncoproteina di fusione PML/RAR α che interferisce con il differenziamento mieloide reprimendo la trascrizione dei geni responsivi all'acido retinoico tutto-trans (ATRA). Il gruppo in cui ho svolto la mia attività di ricerca ha precedentemente dimostrato che un ristretto gruppo di microRNA (miRNA), piccoli RNA non codificanti che regolano l'espressione genica a livello post-trascrizionale, è differenzialmente espresso in blasti di LAP ed è modulato dal trattamento differenziante con ATRA. Il confronto dell'espressione di questi miRNA in promielociti normali e in blasti di LAP alla diagnosi, ha rivelato in questi ultimi una ridotta espressione del miRNA let-7c. Il let-7c appartiene alla famiglia di miRNA let-7, che gioca ruoli importanti in varie attività cellulari, e diversi membri di questa famiglia sono specificamente repressi in vari tipi di tumori. Per quanto riguarda le leucemie, il let-7c è ipo-espresso anche in pazienti affetti da LAM con t(8;21) e inv16.

Sulla base di questi dati, il presente lavoro di tesi si propone di valutare il ruolo funzionale del let-7c nella leuchemiogenesi delle LAM e di identificare i potenziali bersagli molecolari coinvolti. A tale scopo, abbiamo iper-espresso il let-7c in linee cellulari di LAM. Abbiamo trovato che l'iper-espressione del let-7c induce differenziamento mieloide in tutte le linee analizzate, come valutato attraverso analisi morfologica ed immunofenotipica. In particolare, i livelli di CD11b, un antigene di membrana tipicamente associato al differenziamento granulomonocitario, sono aumentati in cellule che iper-esprimono il let-7c, sia in assenza di trattamenti che in combinazione con ATRA. In accordo con questi dati, blasti primari derivati da pazienti LAM di nuova diagnosi, infettati con un lentivirus esprimente let-7c, mostrano un'induzione del differenziamento mieloide, con un incremento d'espressione dell'antigene di membrana CD11b. Inoltre, abbiamo evidenziato che l'iper-espressione del let-7c in cellule LAM promuove il differenziamento specificamente lungo la linea granulocitaria. Abbiamo infine identificato PBX2, un membro della super-famiglia delle proteine a omeodominio TALE, come un nuovo bersaglio diretto del let-7c. I nostri dati mostrano che il silenziamento di PBX2 in linee cellulari leucemiche contribuisce al differenziamento mieloide indotto da

ATRA, suggerendo che l'azione pro-differenziante del let-7c possa esplicarsi anche attraverso la repressione di PBX2.

In conclusione, i risultati ottenuti indicano che l'iper-espressione del let-7c induce uno specifico differenziamento granulocitario in cellule di LAM. PBX2 è un nuovo bersaglio diretto del let-7c, ed il suo silenziamento in un contesto leucemico favorisce il differenziamento indotto da ATRA. Il let-7c sembra quindi essere una nuova molecola implicata nei complessi meccanismi molecolari che controllano il differenziamento leucemico, e potrebbe essere un nuovo potenziale bersaglio terapeutico nelle LAM.

INTRODUZIONE

Capitolo 1. L'ematopoiesi

1.1 Cenni generali

L'ematopoiesi, o emopoiesi, è un processo biologico altamente complesso e finemente regolato, che porta alla produzione dei vari tipi cellulari del sangue, le cui funzioni sono ampiamente diversificate e vanno dal trasporto dell'ossigeno all'immunità. Nell'essere umano adulto, le cellule ematiche sono formate nel midollo osseo dello scheletro assiale, e dall'infanzia all'età adulta gli spazi occupati dal midollo emopoietico si riducono progressivamente alla parte centrale dello scheletro. Il mantenimento di questo raffinato sistema dipende dalle cellule staminali ematopoietiche del midollo osseo (Haematopoietic Stem Cells, HSC), una piccola popolazione di cellule auto-rinnovantesi pluripotenti, ovvero capaci di differenziare nei vari tipi cellulari specializzati del sangue. Le HSC sono caratterizzate da tipici profili di espressione proteica. In particolare queste cellule, che nell'uomo possono derivare dal sangue periferico e da sangue di cordone ombelicale, oltre che dal midollo osseo, si presentano CD34+ (CD34 è una molecola di adesione cellulare) e CD38- (CD38 è un enzima multifunzionale, particolarmente espresso nei leucociti). La cellula staminale ematopoietica segue percorsi di sviluppo specifici durante la maturazione, i quali sono finemente orchestrati da fattori trascrizionali intra-cellulari, e da segnali extra-cellulari come i fattori di crescita, presenti nel micro-ambiente specializzato delle nicchie ematopoietiche del midollo osseo (Zhang et al, 2003).

Nel midollo si possono distinguere due grandi categorie (o serie) di cellule, entrambe derivate dalla stessa cellula staminale ematopoietica pluripotente: la serie linfoide, che comprende i linfociti e le plasmacellule che da essi originano, e la serie mieloide (detta anche non linfoide), che comprende in pratica tutti gli altri tipi di cellule ematopoietiche (globuli rossi, globuli bianchi, piastrine e loro precursori). Le cellule più immature di entrambe le serie, in condizioni normali, sono meno del 5% di tutte le cellule midollari. Una rappresentazione schematica delle linee di maturazione emopoietiche è illustrata in **Figura 1**.

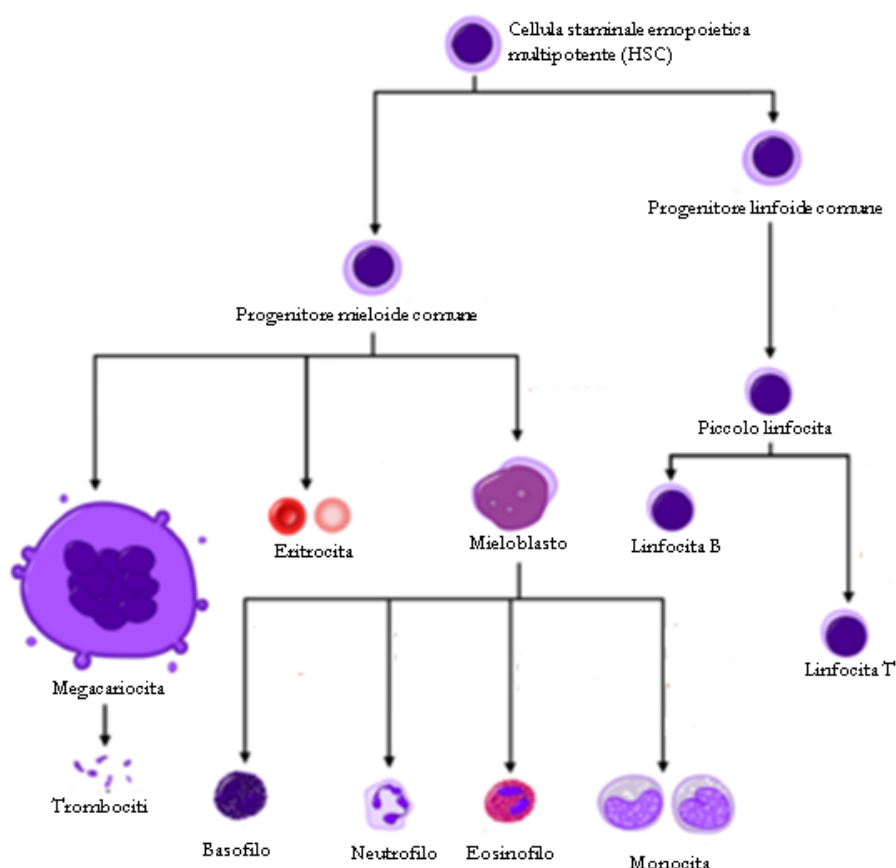


Figura 1. Diagramma rappresentante lo sviluppo dei diversi tipi cellulari del sangue dalla cellula staminale ematopoietica pluripotente fino alle cellule mature.

1.2 La mielopoiesi

Per il lavoro di ricerca descritto in questa tesi, particolarmente utile è una digressione sulla mielopoiesi, il processo differenziativo della serie mieloide del midollo osseo ematopoietico, che attraverso varie tappe maturative porta alla produzione di globuli rossi, granulociti, monociti, e megacariociti-trombociti. Il primo passo nel differenziamento della cellula ematopoietica verso la serie mieloide è la produzione di un precursore mieloide comune dalla cellula staminale ematopoietica (definito anche CFU-GEMM), che esprime marcatori addizionali, tra i quali CD33, rispetto a quelli presenti nelle cellule staminali CD34+. Dalla CFU-GEMM successivamente si originano i precursori delle diverse serie mieloidi (l'eritroide, la granulocito/monocitaria, e quella megacariocitaria), lungo le quali le cellule divengono sempre più specializzate nelle loro funzioni.

Gli eritrociti maturi sono formati da cellule che formano la colonia eritroide (BFU-E, CFU-E), le quali maturano progressivamente in precursori più differenziati, sino a perdere il nucleo e trasformarsi in reticolociti, che dopo 2-4 giorni diventano eritrociti maturi.

I trombociti (o piastrine) sono piccole unità di citoplasma che si separano da cellule giganti presenti nel midollo osseo, definite megacariociti. Questi ultimi sono generati da uno specifico precursore mieloide, l'unità formante colonie megacariocitarie (CFU-MK).

Si ritiene invece che monociti e granulociti siano generati da un precursore comune, denominato *in vitro* unità formante colonie granulocito-monocitarie (CFU-GM), il quale si divide poi ulteriormente in cellule destinate a maturare lungo la linea granulocitaria (granulopoiesi) o monocitaria (monocitopoiesi). Appena i progenitori mieloidi cominciano a maturare lungo la linea granulocito/monocitaria, acquisiscono caratteristici marcatori tra i quali CD38, espresso sui mieloblasti, ma perdono marcatori "precoci" come CD33, il quale non è presente oltre lo stadio di mielocita. Nella monocitopoiesi, il promonocito è l'unico precursore specifico individuabile nel midollo osseo, caratterizzato da un nucleo tondeggianti e citoplasma basofilo. Durante il differenziamento, il promonocito acquisisce una morfologia caratteristica, con una progressiva lobulazione del nucleo e acquisisce motilità, sino a divenire un monocita maturo. Il monocita circolante nel sangue, in risposta a stimoli specifici, può essere reclutato nei tessuti e differenziare ulteriormente in macrofago (Meuret, 1974). A livello molecolare, durante la monocitopoiesi si acquisiscono marcatori specifici per la funzione monocitaria, tra i quali CD14, una glicoproteina di membrana coinvolta nell'immunità innata, che funziona da co-recettore per il riconoscimento del lipopolisaccaride batterico (Kitchens, 2000).

Nella granulopoiesi, il mieloblasto rappresenta il primo stadio morfologicamente distinguibile, con un nucleo eucromatico e scarso citoplasma basofilo privo di granulazioni. Il promielocita è lo stadio maturativo successivo, caratterizzato dalla comparsa di granuli citoplasmatici e la progressiva scomparsa dei nucleoli. Negli stadi successivi (mielocita, metamielocita e granulocita maturo) si osserva una riduzione del volume cellulare, un aumento del citoplasma rispetto al nucleo, e la progressiva scomparsa di basofilia con granulazioni che riempiono tutto il citoplasma. Il nucleo si condensa, si appiattisce, e mostra intaccature sempre più evidenti, fino allo stadio di granulocita maturo, quando il nucleo risulta più deformato e diventa multilobato o segmentato. Anche durante la granulopoiesi vengono acquisiti marcatori di membrana del differenziamento, tra i quali CD11b e CD11c, le catene alfa delle integrine leucocitarie Mac-1 e CR4, le quali regolano i processi immunitari di adesione, migrazione e fagocitosi dei leucociti (Elghetany, 2002).

1.3 Meccanismi molecolari del differenziamento ematopoietico

L'ematopoiesi è caratterizzata da un sistema mantenuto da un imponente *turn-over* cellulare che rigenera continuamente i suoi elementi a partire da un numero relativamente basso di cellule staminali con capacità auto-rinnovanti, attraverso un processo di divisione cellulare e differenziamento. La proliferazione e la sopravvivenza dei precursori emopoietici sono regolate da fattori di crescita linea-specifici e dai loro recettori. Allo stesso modo, un complesso di fattori di trascrizione controlla l'espressione di gruppi di geni linea-specifici, e dirige le cellule lungo i percorsi maturativi che portano le cellule staminali a divenire progenitori cellulari precoci, fino a cellule terminalmente differenziate della linea mieloide e linfoide.

Nell'ematopoiesi, giocano un ruolo importante due classi di recettori di fattori di crescita: recettori con un'attività tirosina-chinasi intrinseca, e recettori che non hanno una propria attività enzimatica. Dei primi, se ne conoscono più di 30 espressi sulla membrana plasmatica dei precursori CD34+, e membri importanti di questo gruppo sono i recettori dei fattori di crescita derivati da piastrine (PDGFR), il recettore di M-CSF, Fms, i recettori per KL (SCF) e FL, Kit e FLT3. Il legame dello specifico substrato extra-cellulare induce in questi recettori la trasmissione di un segnale intra-cellulare, attraverso il legame o la fosforilazione di intermedi citoplasmatici (Schlessinger, 2000). La seconda classe di recettori è generalmente costituita da etero-dimeri, costituiti di una sub-unità α che contiene il sito di legame per il ligando, e di una sub-unità β che trasmette il segnale intra-cellulare attraverso l'interazione con chinasi intra-cellulari delle famiglie Src o JAK. La via del segnale prominente di questa classe di recettori è la via JAK/STAT (Ihle, 2001). L'attivazione dei vari recettori dei fattori di crescita ematopoietici è seguita quasi invariabilmente dall'attivazione di numerose cascate del segnale intra-cellulari strettamente inter-connesse, le quali inducono cambiamenti dell'espressione genica o modificazioni post-traduzionali di proteine importanti per la proliferazione e la sopravvivenza del precursore emopoietico.

Informazioni importanti riguardo i fattori di trascrizione coinvolti nell'ematopoiesi sono stati ottenuti attraverso il *knock-out* o l'iper-espressione di questi fattori in modelli murini. Sebbene i meccanismi molecolari dell'ematopoiesi non siano stati ancora perfettamente chiariti, si ritiene che le cellule staminali esprimano bassi livelli dei fattori di trascrizione linea-specifici. Successivamente, le interazioni con il micro-ambiente e lo stroma, così come le differenze locali di concentrazione dei fattori di crescita, portano all'espressione dei fattori di trascrizione specifici e all'attivazione di programmi differenziativi che dirigono la maturazione lungo una specifica serie ematopoietica (Orkin, 2000). Questi fattori di trascrizione si possono

suddividere in due categorie generali: fattori come SCL e AML1, che sono coinvolti in quasi tutte le linee differenziative, e fattori che hanno invece “pattern” di espressione linea-specifici. AML1 (chiamato anche RUNX1) è una proteina regolatoria con un ruolo centrale nei primi stadi dell’ematopoiesi, e il *knock-out* della sua espressione ha effetto sull’intero comparto ematopoietico (Wang et al, 1996). AML1 è quindi chiaramente coinvolto nell’ematopoiesi precoce, ma non è chiaro se abbia un ruolo importante anche nelle fasi tardive linea-specifiche. GATA-1 è stato il primo fattore di trascrizione linea-specifico ad essere stato identificato, e la sua funzione principale è quella di dirigere la maturazione dei precursori emopoietici verso il comparto eritroide e megacariocitario, inibendo il fattore trascrizionale PU.1 (Nerlov et al, 2000).

Nell’ambito della mielopoiesi, numerosi studi hanno sottolineato l’importanza di due fattori di trascrizione: PU.1 e C/EBP α . La funzione biologica di PU.1 si pone leggermente a valle rispetto a AML1 nel processo di differenziamento. Mentre AML1 gioca un ruolo nello sviluppo delle HSC da emo-angioblasti, PU.1 è importante per il differenziamento delle HSC. Inoltre, sembra necessario per lo sviluppo dei precursori mieloidi multipotenti (Anderson et al, 2000). PU.1 regola l’espressione di numerosi geni mieloidi, inclusi i recettori del fattore stimolante colonie granulocitarie-monocitarie (GM-CSFR), del fattore stimolante colonie granulocitarie (G-CSFR) e macrofagiche (M-CSF; Hohaus et al, 1995; Smith et al, 1996; Iwama et al, 1998). E’ stato proposto un modello affascinante che spiegherebbe l’implicazione di PU.1 nella mielopoiesi: la continua espressione di questo fattore condurrebbe lungo un percorso differenziativo di “default” dei precursori mieloidi, quello che porta alla formazione di monociti-macrofagi. La perturbazione di questo programma operata dai fattori C/EBP, i quali possono inibire la funzione di PU.1, porterebbe al differenziamento granulocitario (Tenen, 2003).

A differenza di PU.1, C/EBP α ha una funzione più specifica nella granulopoiesi. Il ruolo principale di questo fattore di trascrizione “a cerniera di leucina” (*leucine zipper*) nell’ematopoiesi è lo sviluppo dei granulociti. Il silenziamento di C/EBP α comporta un blocco del differenziamento granulocitario, senza influenzare la maturazione di altri tipi cellulari ematopoietici, inclusi i monociti (Zhang et al, 1997). Questi risultati confermano il modello per cui PU.1 sia richiesto per lo sviluppo di precursori mieloidi multipotenti CFU-GM a partire dalle HSC, e promuove un programma maturativo di default verso i monociti. C/EBP α è in grado di “deviare” questo programma direzionando il differenziamento verso l’alternativo percorso granulocitario. Uno schema riassuntivo del coinvolgimento di questi fattori nell’ematopoiesi è mostrato in **Figura 2**.

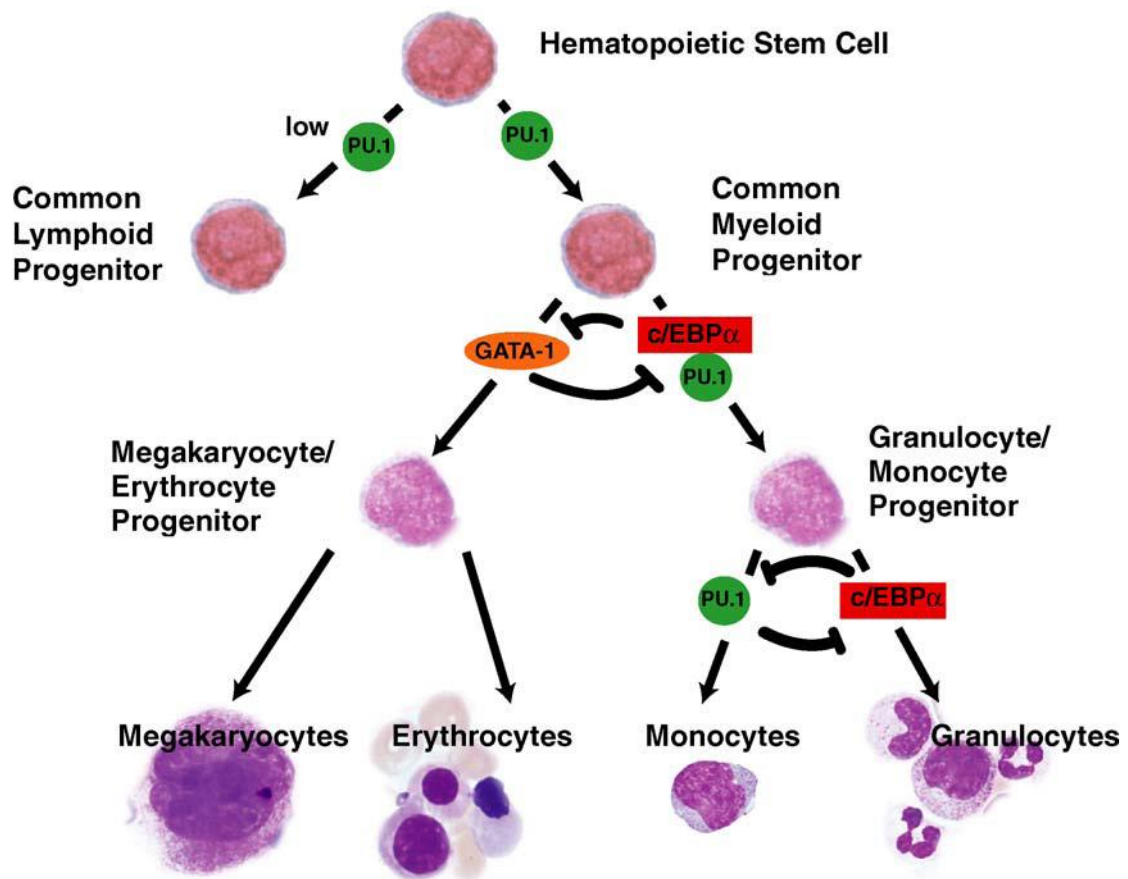


Figura 2. Diagramma rappresentante il coinvolgimento dei fattori GATA-1, PU.1 e C/EBPα nel differenziamento ematopoietico (da Steffen et al, 2005).

Diversi studi hanno contribuito alla comprensione dei meccanismi molecolari attraverso cui i differenti fattori di trascrizione dirigono la maturazione ematopoietica, la quale è generalmente un processo irreversibile. Innanzitutto, la maggior parte, se non tutti, i fattori di trascrizione ematopoietici sono in grado di regolare positivamente la loro stessa espressione. Questo è stato dimostrato per GATA-1 (Zon et al, 1991), così come per PU.1 (Chen et al, 1995) e C/EBPα (Timchenko et al, 1995). Un'altra funzione molto importante di questi fattori è l'inibizione dei programmi di differenziamento alternativi, e questo è frequentemente ottenuto attraverso interazioni proteina-proteina con gli altri fattori ematopoietici. Un eccellente esempio di questo meccanismo è rappresentato da GATA-1, che può inibire PU.1, e PU.1 che può inibire GATA-1 (Rekhtman et al, 1999). Certamente, una delle funzioni più importanti dei fattori di trascrizione che regolano l'ematopoiesi è l'attivazione di ampi gruppi di geni linea-specifici. Questi geni hanno infatti quasi sempre sui propri promotori siti di legame per i

fattori di trascrizione ematopoietici. Inoltre, i fattori di trascrizione ematopoietici possono contribuire all'espressione di geni del differenziamento anche attraverso l'interazione con complessi che rimodellano la cromatina.

Un'altra funzione di C/EBP α è l'inibizione della proliferazione. In cellule che maturano divenendo terminalmente differenziate e non più proliferanti, ci si potrebbe attendere che i fattori di trascrizione emopoietici inibiscano il ciclo cellulare. In effetti, C/EBP α agisce in questo modo attraverso molteplici meccanismi, quali la regolazione positiva di p21, l'inibizione di E2F e delle CDK (Timchenko et al, 1996; Porse et al, 2001; Wang et al, 2001). Tuttavia, l'inibizione della proliferazione e l'induzione al differenziamento non sono sempre processi correlati, e un fattore di trascrizione potrebbe influenzare il differenziamento senza necessariamente interferire con la proliferazione cellulare (Schuster et al, 2003).

Capitolo 2. La leucemia mieloide acuta

2.1 Le leucemie

Per leucemie si intende un gruppo eterogeneo di malattie neoplastiche, che prevedono un qualsiasi processo di alterazione proliferativa a carattere progressivo ed irreversibile, delle cellule emopoietiche del midollo osseo. Le leucemie hanno origine dalla trasformazione maligna di una cellula progenitrice staminale ematopoietica, con alterazione della proliferazione e del differenziamento della stessa e delle cellule derivanti mieloidi e linfoidi (globuli bianchi) e/o eritroidi (globuli rossi) e/o megacariociti (piastrine).

Nelle leucemie, i blasti presentano un vantaggio proliferativo nei confronti del tessuto normale; in questo modo vengono prodotte più cellule di quante ne muoiano e queste, accumulandosi nel midollo osseo, determinano un'alterazione della proliferazione e del differenziamento delle normali cellule ematopoietiche.

L'entità del difetto maturativo dei precursori leucemici e la rapidità di insorgenza della malattia nei pazienti consente di separare nettamente le forme acute, caratterizzate da elementi cellulari poco differenziati, dalle leucemie croniche che presentano elementi ben definiti, e un decorso più lento e stabile nel tempo. Tale distinzione è di notevole importanza non solo sul piano biologico, ma anche e soprattutto sul piano clinico, per le implicazioni di ordine prognostico e terapeutico che da essa derivano.

Dal punto di vista qualitativo la proliferazione neoplastica può interessare i precursori della linea cellulare linfopoietica (leucemia linfoide), oppure quelli della linea mielopoietica (leucemia non linfoide o mieloide). Le leucemie quindi, in base al tipo cellulare coinvolto ed alle caratteristiche cliniche, possono essere suddivise in leucemie mieloidi acute (LAM) e croniche (LCM), e linfoidi acute (LAL) e croniche (LCL).

2.2 La leucemia mieloide acuta: caratteristiche generali

Per il presente lavoro, particolare importanza rivestono le leucemie mieloidi acute, che rappresentano il 25% circa delle leucemie diagnosticate negli adulti. Le LAM sono forme rapidamente progressive, che coinvolgono cellule immature le quali proliferano in maniera afinalistica ed incontrollata, e sono incapaci di maturare in maniera ordinata e di adempiere le proprie funzioni. La LAM si può definire un disordine ematopoietico clonale, causato da

alterazioni genetiche a carico delle cellule staminali ematopoietiche. A causa delle mutazioni genetiche accumulate, i blasti leucemici possono anche inibire il differenziamento dei precursori mieloidi normali del midollo, a causa di specifiche chemochine prodotte dai blasti tumorali (Youn et al, 2000). Sul piano biologico questa proliferazione aberrante, originatasi a livello del midollo osseo, si diffonde poi agli altri organi con potenzialità emolinfopoietica (milza, linfonodi, fegato), invadendo successivamente tutti i tessuti dell'organismo. In questo modo, in assenza di trattamenti la LAM conduce a emorragie, infiltrazioni in altri organi e infezioni fatali entro un anno dalla diagnosi (Estey e Döhner, 2006; Lowenberg et al, 1999).

Negli ultimi 30 anni, il trattamento delle LAM si è basato su combinazioni di chemioterapici quali le antracicline, principalmente daunorubicina, idarubicina e citarabina (Tallman et al, 2005). Il trattamento si divide in due fasi: una prima fase di induzione, che ha come obiettivo la remissione della malattia (con una possibile post-induzione), e una seconda fase di terapia post-remissione. Generalmente, il trattamento delle LAM include almeno un ciclo di chemioterapia intensiva di induzione, seguita da un addizionale ciclo di intensivo di terapia di consolidamento, a cui fa seguito una terapia di mantenimento.

Il tasso di remissione e la sopravvivenza alle LAM varia grandemente in base all'età del paziente e alla citogenetica dei blasti leucemici, ma rimane comunque il più basso di tutte le leucemie (Estey e Döhner, 2006); alcuni studi mostrano infatti come il tasso di sopravvivenza a 5 anni sia del 55% per pazienti con una citogenetica "favorevole", il 24% per pazienti a rischio intermedio, e solo il 5% per pazienti con citogenetica "sfavorevole" (Byrd et al, 2002).

2.3 La classificazione Franco-Americana-Britannica

Nelle LAM, l'accumulo dei blasti leucemici si origina principalmente a causa dell'incapacità dei precursori mieloidi di maturare completamente, perciò i sistemi di classificazione tradizionali hanno utilizzato la morfologia cellulare per definire diversi sottotipi di LAM. Questi sottotipi sono definiti sulla base dello stadio in cui si verifica il blocco del differenziamento normale. Le notevoli divergenze nella nomenclatura classificativa adoperata fino ad oggi, sono state superate dagli studi effettuati da un gruppo cooperativo che ha elaborato un sistema di classificazione ormai universalmente adottato: la classificazione Franco–Americana–Britannica (FAB, Bennett et al, 1985).

In base a questa convenzione, i principali criteri su cui si deve basare una corretta classificazione delle leucemie acute sono rappresentati da:

- Morfologia delle cellule leucemiche del midollo osseo e del sangue periferico dopo colorazione panottica (May–Grünwald, Wright, Romanovsky).
- Comportamento di alcune reazioni citochimiche capaci di mettere in evidenza attività enzimatiche e/o prodotti del metabolismo intracellulare con aspetti peculiari per determinate linee cellulari.

Per quanto riguarda le LAM, il gruppo cooperatore FAB ha identificato almeno i seguenti sottotipi:

M0 = (leucemia mieloblastica acuta altamente indifferenziata) Vi è predominanza di blasti di aspetto completamente indifferenziato. L'identificazione può avvenire solo per mezzo di anticorpi monoclonali specifici.

M1 = (leucemia mieloblastica acuta non differenziata) Vi è una prevalenza di blasti indifferenziati; il nucleo è rotondeggiante od ovale con uno o più nucleoli evidenti e cromatina finemente distribuita; citoplasma con scarsi granuli azzurrofilo e rarissimi corpi di Auer. La quota mieloide maturante è inferiore al 10% e quella monocitaria al 20%. Le indagini citochimiche dimostrano la positività della mieloperossidasi (MPO) nel 3% dei blasti; anche la naftolo AS-D acetato esterasi (NASD-AE) risulta positiva, ma in maniera debole e senza inibizione da parte del NaF.

M2 = (leucemia mieloblastica acuta differenziata) Vi è predominanza di blasti con evidenti segni di differenziamento granulocitario; il nucleo è con più nucleoli e cromatina finemente distribuita; il citoplasma è ricco di granulazioni azzurrofile e corpi di Auer. La quota mieloide maturante è superiore al 10% e spesso presenta anomalie morfologiche. Intensa risulta la positività alla MPO e alla NASD-AE non inibita dal NaF.

M3 = (leucemia promielocitica acuta) E' caratterizzata dalla predominanza di blasti di tipo promielocitico con nucleo irregolare, talora reniforme o bilobato; il citoplasma è ricchissimo di granulazioni azzurrofile associate a numerosi corpi di Auer. Le indagini citochimiche dimostrano la massima positività alla MPO, mentre risulta positiva e non inibita dal NaF la NASD-AE.

M4 = (leucemia mielomonocitica acuta) Vi è presenza nel sangue periferico e nel midollo osseo di blasti ad orientamento mieloide e monocitario, questi ultimi in proporzione variabile, ma sempre superiore al 20%. La positività alla MPO è intensa negli elementi della linea mieloide, mentre risulta praticamente negativa nei precursori monocitari. I blasti monocitici presentano, però, una spiccata positività per l'alfa naftilacetato esterasi (ANAE) e per la

NASD-AE con inibizione, nel caso di questa ultima, da parte del NaF.

M5 = (leucemia monocitica acuta) Vi è prevalenza di elementi della linea monocitaria. Si distinguono: una varietà A (M5A) con prevalenza di elementi più indifferenziati di tipo monoblastico caratterizzati da grossa taglia, nucleo rotondo od ovale con nucleoli evidenti, ampio citoplasma basofilo in cui si osservano fini granulazioni azzurrofile; una varietà B (M5B) in cui le cellule presentano aspetti più differenziati, di tipo promonocitico–monocitico. Per l'identificazione di tale varietà risultano indispensabili le indagini citochimiche che dimostrano un'intensa positività della NASD-AE, fortemente inibita dal NaF, e dell'ANAE.

M6 = (eritroleucemia) E' una varietà molto rara, caratterizzata dalla proliferazione di elementi leucemici appartenenti alle linee eritroblastiche e granuloblastiche. La percentuale di cellule eritroidi midollari deve essere superiore al 50%; inoltre i blasti mieloidi devono rappresentare almeno il 30% della popolazione non eritroblastica midollare. Le indagini citochimiche possono mettere in evidenza in una percentuale variabile di eritroblasti una spiccata positività alla colorazione Schiff-acido periodico (PAS).

M7 = (leucemia megacarioblastica) E' una varietà abbastanza rara, caratterizzata da blasti che possono presentare un aspetto indifferenziato o talora di tipo linfoide. Le indagini citochimiche possono evidenziare una PAS positività ed una positività focale della ANAE senza tuttavia aspetti di specificità.

2.4 Patogenesi molecolare della leucemia mieloide acuta

Oltre alle differenze morfologiche e citochimiche manifestate dai blasti leucemici, la LAM è una patologia estremamente eterogenea sotto il profilo genetico. E' ormai generalmente accettato che la patogenesi molecolare delle leucemie sia, almeno nella gran parte dei casi, un processo multi-stadio, nel quale l'accumulo di distinte lesioni genetiche porta alla crescita clonale di precursori immaturi ed all'insorgenza della malattia. L'attenzione della ricerca contro il cancro è stata tradizionalmente rivolta allo studio di oncogeni e onco-soppressori che regolano la proliferazione e la morte cellulare. Sebbene l'alterazione di questi processi può essere un evento-chiave anche nella patogenesi della LAM, è la distruzione del normale differenziamento cellulare ad avere rilevanza cruciale nell'insorgenza delle leucemie. I difetti dei blasti leucemici possono includere anche un'evasione dalla morte cellulare programmata, instabilità genomica e la disseminazione multi-organo delle cellule leucemiche.

Per quanto riguarda la distruzione dei normali processi di proliferazione e morte cellulare, uno degli eventi patogenetici più importanti nelle LAM è l'alterazione dei meccanismi di

trasduzione del segnale. La crescita clonale di precursori ematopoietici immaturi è dovuta ad una loro aumentata proliferazione e resistenza all'apoptosi, alla quale certamente contribuisce l'attivazione costitutiva e/o aberrante delle vie del segnale controllate dai recettori di fattori di crescita. Sebbene la proliferazione sia regolata nei precursori ematopoietici normali dai fattori di crescita e dai segnali di adesione, nelle cellule leucemiche può essere avviata in modo autonomo. In effetti, l'attivazione aberrante di molecole implicate nella trasduzione del segnale è stata riscontrata circa nel 50% delle LAM primarie (Steffen et al, 2005). Questa proliferazione aberrante è spesso il risultato di mutazioni geniche che influenzano le vie del segnale, e colpiscono i recettori tirosina-chinasici di membrana Flt3 e Kit, oppure le proteine che ricevono il segnale a valle da questi recettori, come N-Ras e K-Ras (Vedi anche *Capitolo 2.4.2 Mutazioni geniche comuni*). Queste lesioni possono anche alterare la sopravvivenza cellulare, principalmente stimolando la via del segnale della fosfatidil-inositolo trifosfato chinasi, e comportando un'evasione dei blasti dai programmi apoptotici. La caratterizzazione delle anomalie delle vie del segnale ha concentrato l'attenzione sulla proliferazione cellulare come potenziale bersaglio terapeutico nelle LAM. Tuttavia, l'ostacolo principale a questa strategia è rappresentato dai molti modi attraverso i quali nelle LAM il segnale delle chinasi può essere attivato.

Il blocco del differenziamento è un'altra tipica anomalia dei blasti leucemici, e le LAM rappresentano un eccellente modello per studiare il legame tra la regolazione del differenziamento e la progressione tumorale. Come già descritto (vedi *Capitolo 1.3 Meccanismi molecolari del differenziamento ematopoietico*), è necessario un corretto bilancio di fattori di trascrizione generali e linea-specifici per attivare i profili di espressione genica necessari per il differenziamento dei vari stipiti ematopoietici. Frequentemente, nelle LAM le lesioni genetiche colpiscono, direttamente o indirettamente, questi fattori di trascrizione, causando un difetto nel differenziamento ematopoietico. Fondamentalmente, due tipi di lesioni genetiche contraddistinguono questa leucemia e contribuiscono al fenotipo dei blasti leucemici: riarrangiamenti cromosomici e mutazioni geniche. I riarrangiamenti cromosomici possono distruggere il normale differenziamento a vari livelli. Fattori di trascrizione importanti possono essere direttamente implicati nella traslocazione, oppure i riarrangiamenti coinvolgono un coattivatore che risulta espresso in maniera aberrante. Le mutazioni puntiformi possono colpire i fattori di trascrizione ematopoietici quali PU.1 e C/EBP α , e possono condurre così al blocco del normale differenziamento mieloide (Vedi anche *Capitolo 2.4.2 Mutazioni geniche comuni*). Può essere importante considerare che molti pazienti di LAM che hanno mutazioni in PU.1 e C/EBP α non hanno traslocazioni cromosomiche. E' possibile

quindi che le proteine di fusione tipicamente associate a queste leucemie distruggano le funzioni di PU.1 e C/EBP α . In effetti, è stato dimostrato che la proteina di fusione AML1/ETO, prodotta dalla traslocazione t(8;21) (Vedi anche *Capitolo 2.4.1 Anomalie citogenetiche nella leucemia mieloide acuta*), distrugge la funzione di C/EBP α (Westendorf et al, 1998).

Il contributo dei diversi eventi mutazionali che portano al cancro può variare nelle LAM, e le caratteristiche dei blasti leucemici possono differire da un caso ad un altro sulla base delle lesioni geniche che si sono prodotte. Perciò possono esistere casi in cui l'accumulo dei blasti è principalmente determinato da un'inappropriata proliferazione in assenza di normali fattori di crescita, e da un auto-rinnovamento incontrollato delle cellule staminali, piuttosto che da un blocco del differenziamento, e altri in cui il principale difetto dei blasti è l'incapacità di raggiungere un differenziamento terminale.

In passato la LAM era considerata una neoplasia "monolitica", che prevedeva un trattamento chemioterapico pressoché unico per tutti i pazienti. Oggi, la grande diversità genetica che lo studio delle LAM ha svelato lascia spazio alla prospettiva di terapie personalizzate.

2.4.1 Anomalie citogenetiche nella leucemia mieloide acuta

La grande eterogeneità genetica delle LAM richiama il problema di un'appropriata classificazione sia per la comprensione dei meccanismi che intervengono nella patogenesi della malattia, che per il valore prognostico che ne può derivare e la definizione di strategie terapeutiche mirate. Sebbene il valore diagnostico del dato morfologico e cito-chimico sia rimasto tuttora inalterato, appare sempre più importante affiancare alla classificazione FAB anche una classificazione citogenetica, basata sull'identificazione di riarrangiamenti non casuali del cariotipo. Le aberrazioni cromosomiche sono una caratteristica frequentemente riscontrata nelle leucemie. Tali riarrangiamenti possono essere evidenziati, oltre che con la citogenetica tradizionale, anche con l'ibridazione *in situ* fluorescente (FISH), che impiega sonde molecolari specifiche per i geni coinvolti nell'anomalia, o con la RT-PCR, che utilizza sequenze nucleotidiche complementari a quelle localizzate alle estremità 3' e 5' del gene di fusione. Un'altra possibilità consiste nella dimostrazione della proteina chimerica, utilizzando un anticorpo monoclonale specifico. Le anomalie del cariotipo presenti nella LAM comprendono traslocazioni reciproche e non, inversioni, trisomie, monosomie e delezioni. Traslocazioni reciproche e inversioni peri-/paracentriche sono presenti nel 40% circa dei pazienti affetti da LAM. Un ampio numero di studi ha chiaramente dimostrato un ruolo centrale di questi riarrangiamenti genici nella leuchemiogenesi. Tali studi hanno evidenziato che: geni di fusione specifici correlano strettamente con specifici fenotipi tumorali; le terapie di successo sono

associate ad un decremento o alla eradicazione della chimera associata alla malattia; i costrutti dei geni di fusione sono in grado di generare in modelli animali disordini simili a quelli osservati nelle leucemie umane; il silenziamento dei trascritti di fusione *in vitro* contrasta la leuchemiogenesi e la proliferazione cellulare, e può indurre il differenziamento (Mitelman et al, 2007). L'importanza delle anomalie citogenetiche è sottolineata dal fatto che, ad oggi, la principale stratificazione del rischio dei pazienti di LAM è definita su criteri citogenetici, dividendo i pazienti in tre grandi gruppi prognostici: pazienti con una prognosi favorevole, che portano specifiche aberrazioni cromosomiche quali t(8;21), t(15;17) e inv16, a prognosi intermedia (cariotipo normale), e a prognosi sfavorevole (anomalie del cariotipo complesse). Molti di questi riarrangiamenti coinvolgono loci genici codificanti attivatori trascrizionali, i quali generano una proteina di fusione che mantiene la capacità di legarsi al DNA, ma la cui attività trascrizionale è aberrante. L'alterata regolazione dei geni bersaglio necessari per un normale sviluppo mieloide conduce infine alla trasformazione leucemica.

2.4.1.1 La leucemia promielocitica acuta

La traslocazione t(15;17) è tipicamente riscontrata in più del 95% dei casi di leucemia promielocitica acuta (LAP), che rappresenta circa il 10% di tutte le LAM ed ha caratteristiche morfologiche corrispondenti ai sottotipi FAB M3 (80%) o vM3 (20%, variante ipogranulare). La t(15;17) genera l'oncogene di fusione PML/RAR α , che ha un ruolo centrale nella leuchemiogenesi dei blasti LAP (Melnich e Lich, 1999).

Il gene PML codifica per una proteina che regola la senescenza e l'apoptosi: è ormai dimostrato che PML sopprime la crescita cellulare se overespresso e, ad oggi, è considerato un oncosoppressore sia nelle leucemie che nei tumori solidi (Gurrieri et al, 2004). PML è caratterizzato da una particolare distribuzione all'interno di determinate regioni nucleari chiamate PODs (PML Oncogenic Domains) o NB (Nuclear Bodies, corpi nucleari), dove ha un ruolo centrale come "impalcatura" per l'assemblaggio e il disassemblaggio delle proteine che compongono i NB. Nella t(15;17) i NB risultano disgregati e PML assume una localizzazione micro-diffusa (Melnich e Lich, 1999; Carracedo et al, 2011).

Il gene RAR α , invece, codifica per un membro della famiglia dei recettori nucleari per i retinoidi (RARs). In assenza di acido retinoico tutto-trans (ATRA), RAR α si lega ai siti RARE (Retinoic Acid Responsive Elements) dei geni bersaglio come etero-dimero insieme ad un'altra proteina ad essa correlata, il recettore dei retinoidi X (RXR). L'etero-dimero normale RAR α /RXR recluta complessi di co-repressione e reprime così la trascrizione dei geni bersaglio. Un cambiamento conformazionale, causato dal legame con ATRA a concentrazioni

fisiologiche, promuove la dissociazione dei co-repressori e stimola il reclutamento di co-attivatori. L'onco-proteina PML/RAR α agisce invece come un repressore costitutivo che è insensibile alle concentrazioni fisiologiche di ATRA (Licht, 2006). Numerosi studi hanno dimostrato che il solo PML/RAR α transgenico può indurre LAP in modelli murini (Brown et al, 1997; Grisolan et al, 1997). PML/RAR α compete con RAR α , formando omodimeri e sequestrando RXR. In questo modo PML/RAR α lega gli elementi RARE sui geni bersaglio e media la repressione trascrizionale tramite il reclutamento di DNA metil-trasferasi (DNMT) e/o la de-acetilazione degli istoni per mezzo di complessi N-CoR/Sin3A/HDACs (Di Croce et al, 2002; Insinga et al, 2005; Martens et al, 2010). Di notevole importanza è che blasti di LAP PML/RAR α -positivi sono indotti a differenziare dal trattamento con dosi farmacologiche di ATRA (da 10^{-7} a 10^{-6} M): la LAP è per questo un modello particolarmente interessante nello studio del cancro umano, essendo la prima neoplasia maligna dell'uomo ad essere efficacemente trattata con un induttore del differenziamento cellulare. Dosi farmacologiche di acido retinoico sono necessarie per innescare la degradazione di PML/RAR α e il riasssemblaggio dei corpi nucleari (Yoshida et al, 1996; Nervi et al, 1998). E' generalmente accettato che questo trattamento sia anche in grado di indurre un cambiamento conformazionale di PML/RAR α ; in entrambi i casi, l'ATRA induce la dissociazione dei complessi co-repressori e il reclutamento di proteine con attività di acetilasi istonica (HAT) sui geni bersaglio, aprendo così le strutture cromatiniche e consentendo il ripristino della trascrizione genica (Grignani et al, 1998; Martens et al, 2010).

L'introduzione di ATRA come terapia principale di trattamento della LAP ha trasformato questo tipo di leucemia dallo stato di neoplasia quasi sempre ad esito fatale, a malattia altamente curabile, con un tasso di remissione clinica (CR) intorno al 90%. L'ATRA di per sé non è curativo, poiché le remissioni ATRA-indotte sono solo transitorie, ma è utile come trattamento prima e in combinazione alle terapie citotossiche intensive, principalmente a base di antracicline, necessarie ad ottenere remissioni prolungate, con una sopravvivenza globale e libera da malattia intorno al 70-80% (Hu, 2011).

E' interessante notare che il gene di fusione reciproco RAR α /PML è anch'esso espresso nei blasti di LAP e codifica per una proteina di fusione. Sebbene le sue proprietà funzionali rimangano poco conosciute, sistemi animali transgenici suggeriscono che possa avere un ruolo nel promuovere il fenotipo leucemico (He et al, 2000; Zimonjic et al, 2000).

Esistono infine rari casi di LAP che non hanno la t(15;17), i quali sono sempre caratterizzati da riarrangiamenti che coinvolgono la ricombinazione di RAR α con partner localizzati su altri siti cromosomici. La t(11;17)(q23;q12) genera una fusione tra RAR α e il gene PLZF

(*Promyelocytic Leukemia Zinc Finger*), il quale codifica per un membro della famiglia dei fattori di trascrizione POZ/zinc-finger (Chen et al, 1993). La t(5;17) fonde il gene della nucleofosmina (NPM) a RAR α (Redner et al, 1996). Altre rare traslocazioni associate alle LAP sono la t(11;17)(q13;q12) che fonde la proteina dell'apparato mitotico nucleare (NuMa) a RAR α (Wells et al, 1997), e la t(17;17) nella quale RAR α è fuso al trasduttore di segnale e attivatore trascrizionale STAT5b (Arnould et al, 1999). Alcune varianti di LAP, generalmente le LAP PLZF/RAR α e STAT5b positive, si sono dimostrate parzialmente o totalmente resistenti alla terapia differenziante con ATRA (Licth et al, 1995; Cheng et al, 1999). Altre varianti, come le LAP NPM1/RAR α e NuMA/ RAR α positive, sono invece responsive all'ATRA.

2.4.1.2 Altre aberrazioni cromosomiche comuni

Il più frequente riarrangiamento cromosomico nelle LAM umane è la traslocazione bilanciata tra i cromosomi 8 e 21, t(8;21), riscontrata in circa 10% di tutte le LAM. Questa traslocazione produce il gene chimerico e la proteina di fusione costituita da una porzione del fattore di trascrizione AML1 fusa alla proteina co-repressoria ETO. La risultante proteina di fusione AML1/ETO funziona come repressore trascrizionale dei geni regolati da AML1, reclutando sui promotori bersaglio complessi di co-repressione trascrizionali come SMRT, N-Cor e Sin3A e proteine con attività di istone deacetilasi (HDACs) (Nervi et al, 2008).

Un altro riarrangiamento relativamente frequente è l'inversione cromosomica inv(16), che viene riscontrata approssimativamente nell'8% dei casi di LAM, e causa la fusione di una porzione ammino-terminale della proteina *core binding factor* β (CBF β) con un tratto carbossi-terminale della catena pesante della miosina del muscolo liscio (MYH11). Normalmente, CBF β interagisce col fattore di trascrizione AML1, modulandone l'attività regolatoria sui promotori dei geni bersaglio. In contrasto, la proteina di fusione CBF β -MYH11 continua a legarsi ad AML1, conferendole però un'abberrante attività repressoria (Lutterbach et al, 1999).

Il gene MLL (*Mixed Lineage Leukemia*) è implicato almeno nel 10% delle leucemie acute, sia LAL che LAM, e nei pazienti LAM le traslocazioni MLL sono generalmente associate ad una prognosi sfavorevole (Eguchi et al, 2005). In condizioni normali, MLL è un enzima con attività istone metil-trasferasi che funziona come un regolatore positivo globale della trascrizione genica. Nelle leucemie acute, le traslocazioni cromosomiche possono fondere MLL ad uno di oltre 50 geni partner, producendo una proteina di fusione MLL che funziona come un potente oncogene (Krivtsov e Armstrong, 2007). Sebbene i meccanismi d'azione molecolari e i bersagli genomici specifici delle proteine di fusione MLL nelle LAM non siano stati ad oggi chiaramente definiti, si ritiene che il dominio ammino-terminale MLL serva per

reclutare l'oncoproteina su loci genici specifici, mentre il partner di fusione funziona come un'unità effettrice, sostenendo una trans-attivazione aberrante del gene bersaglio (Yokohama et al, 2010).

Esistono infine numerose altre traslocazioni bilanciate meno comuni, che collettivamente costituiscono il 6% circa dei casi di LAM. Tra queste, sono importanti le traslocazioni che coinvolgono i geni Hox, codificanti per fattori trascrizionali con un ruolo importante nello sviluppo ematopoietico (Argiropoulos e Humphries, 2007). La traslocazione meglio caratterizzata è la t(7;11), che genera il prodotto di fusione NUP98/HOXA9. NUP98 è una nucleoporina facente parte del complesso del poro nucleare, che può trovarsi fusa anche con altri membri dei geni Hox nelle leucemie, come nella traslocazione NUP98/HOXD13 (Gough et al, 2011). HOXA9 è un membro dei geni Hox espresso nei progenitori ematopoietici precoci, la cui espressione scende durante il differenziamento ematopoietico, fino ad essere non rilevabile nelle cellule terminalmente differenziate (Argiropoulos e Humphries, 2007). L'oncoproteina di fusione NUP98/HOXA9 può promuovere la leuchemiogenesi conferendo un vantaggio proliferativo e una inibizione del differenziamento nei blasti attraverso l'iper-espressione dei geni bersaglio di HOXA9 (Yassin et al, 2009).

Le principali aberrazioni cromosomiche nelle LAM, e le onco-proteine che ne risultano, sono riassunte in **Tabella 1**. In totale, approssimativamente il 35% delle LAM è caratterizzato da traslocazioni cromosomiche ben definite. Circa la metà dei pazienti LAM manifesta invece un cariotipo normale, mentre la rimanente parte ha anomalie cariotipiche complesse. Tuttavia, negli ultimi anni numerose altre anomalie genetiche sono state identificate nei blasti di LAM, che sfuggono all'identificazione tramite analisi citogenetiche. Queste lesioni comprendono mutazioni geniche oppure un'espressione aberrante di specifici geni, che hanno svelato l'esistenza di un'enorme eterogeneità all'interno dei sotto-gruppi di LAM definiti a livello citogenetico.

2.4.2 Mutazioni geniche

Con l'eccezione di AML1, i geni codificanti per fattori di trascrizione coinvolti nel differenziamento mieloidale non sono in genere siti comuni di traslocazioni cromosomiche nelle LAM. Si può allora supporre che i geni codificanti per questi fattori possano essere mutati in un certo numero di pazienti affetti da LAM. Inoltre, considerando che le comuni traslocazioni cromosomiche possono alterare drammaticamente l'espressione di fattori di trascrizione

Traslocazione	Prognosi	FAB	Oncoproteina di fusione	Frequenza nelle LAM
t(8;21)	favorevole	M2	AML1/ETO	10%
t(15;17)	favorevole	M3	PML/RAR α	10%
inv(16)	favorevole	M4	CBF β /MYH11	5%
der(11q23)	variabile	M4/M5	MLL-fusioni	4%
t(9;22)	avversa	M1/M2	BCR/ABL1	2%
t(6;9)	avversa	M2/M4	DEK/KAN	<1%
t(1;22)	intermedia	M7	OTT/MAL	<1%
t(8;16)	avversa	M4/M5	MOZ/CBP	<1%
t(7;11)	intermedia	M2/M4	NUP98/HOXA9	<1%
t(12;22)	variabile	M4/M7	MN1/TEL	<1%
inv(3)	avversa	M1/M2/M4/M6/M7	RPN1/EVI1	<1%
t(16;21)	avversa	M1/M2/M4/M5/M7	FUS/ERG	<1%

Tabella 1. Elenco di onco-proteine di fusione associate alle LAM (modificata da Martens e Stunnenberg, 2010).

importanti per la maturazione ematopoietica, si potrebbe ipotizzare che mutazioni di questi fattori siano frequenti nei pazienti che non hanno traslocazioni.

Difatti, ciò è quello che è stato esattamente osservato in un certo numero di studi. Le mutazioni geniche nelle LAM possono essere generalmente suddivise in due ampie categorie: le mutazioni di *classe I* colpiscono geni coinvolti nelle vie di trasduzione del segnale, e conducono ad un'aumentata proliferazione e sopravvivenza dei progenitori cellulari leucemici; le mutazioni di *classe II* riguardano fattori di trascrizione o componenti dei complessi di co-attivazione trascrizionale, e determinano difetti nel differenziamento.

Nell'ambito della *classe I*, di notevole rilevanza sono le mutazioni che colpiscono il gene FLT3. Il recettore tirosina-chinasi FLT3 e il suo ligando sono importanti per la proliferazione e il differenziamento dei progenitori ematopoietici più immaturi. Nei blasti di pazienti LAM, FLT3 è iper-espresso nel 60-92% dei casi (Drexler, 1996; Rosnet et al, 1996). Le mutazioni somatiche in FLT3 comportano un'attivazione costitutiva del recettore, e sono state identificate all'interno di due domini funzionali del recettore, il dominio giusta-membrana (*Juxtamembrane*; JM) e il dominio tirosina-chinasico (TKD; Nakao et al, 1996; Yamamoto et al, 2001). Il dominio JM, che ha un ruolo cruciale nell'auto-inibizione dell'attività chinastica del recettore, è frequentemente distrutto da duplicazioni interne in tandem (*Internal Tandem Duplications*; ITD), presenti nel 28-34% dei pazienti a cariotipo normale, mentre le mutazioni

puntiformi in questo dominio sono rare (Kottaridis et al, 2001). Nelle LAM, il *loop* di attivazione nel lobo carbossi-terminale del TKD può subire mutazioni puntiformi, piccole delezioni o inserzioni (Mead et al, 2007). Sotto il profilo clinico, le mutazioni di FLT3 sono rilevanti sia per il loro impatto prognostico, sia perché FLT3 costitutivamente attivo rappresenta un interessante bersaglio per la terapia molecolare delle LAM. Numerosi studi hanno infatti chiaramente evidenziato come pazienti di LAM a cariotipo normale con mutazioni FLT3-ITD abbiano un decorso significativamente peggiore rispetto a pazienti che mancano di FLT3-ITD (Kottaridis et al, 2001). Anche nella LAP, dove queste mutazioni sono relativamente frequenti rispetto agli altri sottotipi FAB, la presenza di FLT3-ITD è associata ad un rischio maggiore di fallimento delle terapie (Kainz et al, 2002).

Nei pazienti di LAM, mutazioni geniche sono state riscontrate anche nei geni RAS, con una incidenza maggiore per N-RAS, sporadicamente in K-RAS e solo molto raramente in H-RAS (Döhner, 2007). Ad oggi, sebbene non sia stato attribuito un chiaro significato prognostico alla presenza di queste mutazioni nelle LAM, mutazioni di RAS possono rappresentare un altro obiettivo di terapie molecolari.

Le mutazioni nel gene della nucleofosmina 1 (NPM1) sono relativamente frequenti nei blasti di pazienti LAM, e rappresentano la più comune alterazione genetica riscontrata nei pazienti a cariotipo normale (Falini et al, 2005). NPM1 è un'abbondante fosfo-proteina che, in condizioni fisiologiche, è localizzata nei nucleoli e fa la spola tra nucleo e citoplasma. NPM1 ha un ruolo in numerosi processi biologici, quali la biogenesi dei ribosomi, la risposta allo stress, la stabilità genomica, la trascrizione genica e la regolazione dell'attività di importanti onco-soppressori come *p53* e *ARF* (Grisendi et al, 2006). Queste attività sono legate sia al controllo della proliferazione e sopravvivenza cellulare, che al differenziamento. Per questo motivo, le mutazioni di NPM1 nelle LAM possono considerarsi al confine tra *classe I* e *classe II*. Queste mutazioni generalmente cadono nell'esone 12 del gene, e comportano un accumulo anomalo della proteina nel citoplasma (Falini et al, 2005). Il 40% dei pazienti con mutazioni in NPM1 sono anche portatori di FLT3-ITD. Alcuni studi hanno evidenziato come mutazioni in NPM1 possano rappresentare marcatori di prognosi favorevole, ma solo in assenza di FLT3-ITD (Schnittger et al, 2005; Thiede et al, 2006).

Nell'ambito della *classe II*, di rilievo sono le mutazioni che colpiscono il fattore trascrizionale C/EBP α , una proteina chiave nei processi di differenziamento mieloidi (Vedi *Capitolo 1.3 Meccanismi molecolari del differenziamento ematopoietico*). Sono stati identificati due tipi di mutazioni nel gene di C/EBP α nelle LAM: 1) mutazioni non-senso, che colpiscono la porzione N-terminale della proteina, causando la formazione di una isoforma trunca a funzione di

dominante negativo; 2) mutazioni nel dominio C-terminale a cerniera di leucina, che causano un'inefficace capacità di legare il DNA o di formare omo-dimeri. Alcuni studi evidenziano che le mutazioni in C/EBP α nelle LAM sono associate ad esito favorevole della malattia (Estey e Doher, 2006; Mròzec et al, 2007).

Le mutazioni parziali in tandem del gene MLL (Partial tandem Duplications, PTD) sono state le prime mutazioni riportate avere un ruolo prognostico nelle LAM a cariotipo normale, e sono associate ad una durata più breve di remissione clinica (Estey e Doher, 2006; Mròzec et al, 2007). A differenza delle proteine chimeriche di fusione MLL (vedi *Capitolo 2.4.1.2 Altre aberrazioni cromosomiche comuni*), MLL-PTD conserva tutti i domini funzionali della proteina. La presenza di MLL-PTD è associata al silenziamento dell'allele MLL normale, probabilmente attraverso meccanismi epigenetici.

Le mutazioni del gene *Wilms' Tumor 1* (WT1) nelle LAM furono identificate per la prima volta nel 1998 (King-Underwood e Pritchard-Jones, 1998). WT1 controlla sia la quiescenza dei progenitori ematopoietici che il differenziamento delle cellule mielo-monocitiche; perciò le mutazioni che distruggono le sue funzioni normali possono alterare sia la capacità proliferativa che indurre un blocco del differenziamento nei blasti leucemici.

Esistono infine altre mutazioni geniche, come le mutazioni dell'ubiquitina ligasi CBL, la cui prevalenza e rilevanza clinica non sono state ancora chiaramente determinate (Caligiuri et al, 2007). Inoltre, un certo numero di geni può avere un'espressione deregolata nei blasti di LAM, senza necessariamente essere mutato o oggetto di traslocazioni. I geni *BAALC*, *ERG*, *MN1* e *EVII*, risultano di frequente iper-espressi, e la loro espressione deregolata può avere un significato prognostico (Mròzec et al, 2007).

2.5 La famiglia di proteine PBX e leucemie

2.5.1 Le proteine PBX

Per i risultati ottenuti e descritti in questo lavoro di tesi, è di particolare utilità una breve descrizione delle proteine della famiglia PBX, e della loro implicazione nei processi di leuchemiogenesi. La potenziale associazione delle proteine PBX con le leucemie fu chiara sin dall'identificazione del primo membro della famiglia, PBX1 (pre-B-cell leukemia transcription factor 1), come un proto-oncogene nella leucemia umana indotta dall'oncoproteina di fusione E2a-PBX1 (Kamps et al, 1990; Nourse et al, 1990).

Le proteine PBX sono fattori di trascrizione altamente conservati nelle specie animali, e

appartengono alla particolare sottoclasse PBC di proteine a omeodominio, così definita per il motivo conservato PBC che è presente nella regione proteica N-terminale. La sottoclasse PBC è compresa a sua volta nella super-famiglia TALE (*Three Aminoacid Loop Extension*) di proteine ad omeodominio, così chiamata per l'inserzione di 3 amminoacidi addizionali nel *loop* dell'omeodominio, che caratterizza tutti i membri di questa super-famiglia. La super-famiglia TALE include, oltre alla sottoclasse PBC, la famiglia di fattori trascrizionali Meis/Prep (Moenz e Selleri, 2006). Nei mammiferi, la sottoclasse PBC comprende 4 membri: PBX1, PBX2, PBX3 e PBX4 (Laurent et al, 2008), i quali condividono una elevata omologia di sequenza, sia all'interno dell'omeodominio che lega il DNA, sia nelle regioni fiancheggianti (Monica et al, 1991). Alcuni di questi geni danno origine a varie isoforme, generate attraverso splicing alternativo. In particolare, le proteine PBX sono originate da trascritti che codificano per isoforme grandi (Pbx1a, Pbx2, Pbx3a e Pbx4) e per isoforme piccole (Pbx1b, Pbx3b, Pbx3c e Pbx3d; Monica et al, 1991; Wagner et al, 2001; Milech et al, 2001). Sulla base di studi biochimici, è possibile discriminare chiaramente tra le diverse proteine e isoforme di PBX. Per esempio, le proteine PBX non esibiscono medesime proprietà nel legame del DNA, pur condividendo la medesima sequenza consenso *in vitro*: è stato dimostrato che PBX1 non è in grado di legare il DNA da solo, mentre PBX2 e PBX3 possono farlo in assenza di partner proteici (Neuteboom e Murre, 1997).

L'espressione delle proteine PBX è finemente regolata durante l'embriogenesi, ed è diffusa ai vari tessuti dell'organismo adulto. PBX2 e PBX3 sono ubiquitariamente espressi, con livelli che differiscono a seconda del tipo tissutale, mentre PBX1 ha un pattern d'espressione leggermente diverso, non essendo espresso nei tessuti linfoidei (Monica et al, 1991). In aggiunta al potenziale ruolo oncogenico di PBX1, e' stato riportato che PBX1 e PBX2 sono coinvolti anche nell'ematopoiesi normale (DiMartino et al, 2001; Pillay et al, 2010). Topi knock-out per PBX1 muoiono prima della nascita a E15.5, manifestando una grave ipoplasia, ectopia o aplasia di molti organi interni, e difetti diffusi allo scheletro assiale e appendicolare, tra i quali malformazioni degli elementi prossimali degli arti, costole e vertebre (Selleri et al, 2001). I topi knock-out per PBX3 sono invece vitali alla nascita, ma muoiono entro poche ore per fallimento respiratorio, dovuto ad una attività anormale dei neuroni inspiratori (Rhee et al, 2004). Al contrario, i topi deficienti per PBX2 sono vitali e non mostrano alcun fenotipo anormale, nonostante la diffusa espressione di questo gene durante l'embriogenesi (Selleri et al, 2004); ciò suggerisce che la funzione di PBX2 possa essere compensata dagli altri membri della famiglia PBC. In effetti, Capellini e collaboratori hanno mostrato che la diminuzione di espressione di PBX2 in assenza di PBX1 altera lo sviluppo dell'arto in modo più severo

rispetto alla sola perdita di Pbx1 (Selleri et al, 2001).

2.5.2 PBX e geni Hox nella trasformazione leucemica

Le proteine Hox rappresentano una famiglia di fattori di trascrizione a omeodominio con un ruolo centrale nella specificazione dell'asse antero-posteriore dell'embrione, e profondamente implicati anche nella regolazione del differenziamento ematopoietico (Shah e Sukumar, 2010; Argiropoulos e Humphries, 2007). Sebbene queste proteine siano capaci di avviare dei programmi di sviluppo estremamente specifici, esibiscono una bassa specificità di legame al DNA (Williams et al, 2005). E' stato chiaramente dimostrato che le proteine PBX possono interagire con alcune proteine Hox e, come tali, sono state considerate dei cofattori essenziali per la funzione degli Hox nella regolazione genica dell'embriogenesi e dello sviluppo (Laurent et al, 2008). La formazione di etero-dimeri con i membri della famiglia PBX può incrementare notevolmente la specificità di legame delle proteine Hox al DNA (Moens e Selleri, 2006). L'interazione tra le proteine Hox e proteine TALE non si limita ai membri della famiglia PBX, ma coinvolge anche Meis1, un altro importante fattore trascrizionale della super-famiglia TALE. A sua volta, Meis1 può dimerizzare con le proteine PBX, ed è stata riportata l'esistenza di complessi trimerici tra HoxA9, PBX2 e Meis1 in cellule mieloidi (Shen et al, 1999; Moens e Selleri, 2006). La possibilità di combinazioni multiple tra i vari membri delle famiglie Hox, PBX e Meis espande notevolmente la selettività e la specificità di questi complessi nella regolazione di gruppi di geni specifici in risposta ai diversi segnali cellulari.

In accordo con le loro funzioni nel controllo dell'ematopoiesi, un'espressione aberrante dei geni Hox è associata alla trasformazione leucemica. In particolare, numerose linee di ricerca indipendenti hanno chiaramente dimostrato l'importanza dei geni Hox nella leuchemiogenesi: HoxA9 è coinvolto nella traslocazione t(7;11) nelle LAM (vedi *Capitolo 2.4.1.2 Altre aberrazioni cromosomiche comuni*), e l'iper-espressione di HoxA9 nel midollo osseo murino può indurre LAM, la cui induzione è ulteriormente stimolata dalla co-espressione con Meis1 (Kroon et al, 1998). Inoltre, una co-espressione aberrante di HoxA9 e Meis1 è stata riscontrata anche nelle LAM umane (Lawrence et al, 1999). Numerosi studi hanno evidenziato che l'azione oncogenica delle proteine Hox nelle leucemie è mediata, almeno in parte, dalla loro interazione con i membri della super-famiglia TALE. L'immortalizzazione di progenitori mieloidi *in vitro* mediata da HoxA9 richiede l'interazione funzionale con i cofattori PBX e Meis (Schnabel et al, 2000), e HoxB8 può indurre un blocco del differenziamento mieloide e un fenotipo leucemico interagendo fisicamente con le proteine PBX (Knoepfler et al, 2001). Inoltre, nelle leucemie mediate da MLL, l'induzione e il mantenimento della trasformazione leucemica richiede Meis1

ed il co-dipendente contributo di PBX2 e PBX3 (Wong et al, 2007). Complessivamente, questi studi delineano uno scenario in cui le proteine PBX appaiono necessarie per l'esecuzione dei programmi di sviluppo eseguiti dai geni Hox, sia nei tessuti normali che in un contesto leucemico.

2.5.3 Ruoli Hox-indipendenti delle proteine PBX

Un numero crescente di studi sta evidenziando come le funzioni dei fattori PBX non siano ristrette all'interazione con le proteine Hox. Infatti, le proteine PBX possono interagire con un gran numero di partner proteici, tra i quali solo una piccola percentuale è rappresentata da proteine con omeodominio o fattori trascrizionali (Laurent et al, 2008). Ad esempio, HPIP (Haematopoietic PBX1 Interacting Protein) è una proteina priva di omeodominio che è stata identificata come partner dei fattori PBX nei tessuti ematopoietici (Abramovich et al, 2000). Questa proteina non possiede domini di legame al DNA noti, e modula la funzione dei membri PBC tramite interazioni proteina-proteina. In questo modo, può prevenire *in vitro* il legame al DNA dei complessi Hox-PBX e inibire le proprietà transattivanti dell'oncoproteina di fusione E2a-PBX1.

Le proteine PBX possono interagire anche con partner coinvolti nelle vie cellulari del segnale. E' stato riportato un coinvolgimento dei fattori PBX nelle vie di segnalazione mediate dal TGF β , e membri PBX interagiscono con i recettori nucleari tiroidei nel promuovere la trascrizione genica (Laurent et al, 2008). Inoltre, PBX1 può partecipare al controllo dell'espressione genica reclutando complessi di rimodellamento della cromatina che comprendono HDAC e HAT, come è stato riportato nel differenziamento muscolare e neuronale (Saleh et al, 2000; de La Serna et al, 2005).

Nell'insieme, il numero crescente di proteine regolatorie che si stanno dimostrando essere partner della famiglia PBX mette in evidenza come questi fattori possano avere un ruolo ben più ampio durante lo sviluppo, rispetto a quello precedentemente assegnatogli come semplici cofattori Hox. Trovandosi a valle di vie del segnale cruciali, le proteine PBX sono in grado di avviare programmi di sviluppo e, interagendo con effettori del segnale, possono modellare nuove reti regolatorie. Questa plasticità funzionale potrebbe spiegare la loro localizzazione in aree critiche degli organi in sviluppo. Interagendo con un ampio numero di fattori di trascrizione diversi, formando etero-dimeri, etero-trimeri o multimeri, possono determinare il destino cellulare avviando programmi trascrizionali specifici, in risposta ai diversi stimoli esterni. In questo modo le cellule possono essere infine stimulate a proliferare o indirizzate verso programmi di differenziamento specifici. In questo scenario, alterazioni nell'espressione

delle proteine PBX potrebbero giocare un ruolo nella leuchemiogenesi anche tramite meccanismi Hox-indipendenti.

Capitolo 3. I micro-RNA e le leucemie

3.1 I micro-RNA: biogenesi e meccanismi d'azione

L'identificazione negli anni '90 dei microRNA (miRNA) ha aperto una nuova era nella comprensione dei processi regolatori post-trascrizionali dell'espressione genica. I miRNA sono una ampia classe di piccoli RNA non codificanti formati da 19-25 nucleotidi che regolano negativamente l'espressione genica a livello post-trascrizionale, inducendo la degradazione di specifici RNA messaggeri (mRNA), o impedendone la traduzione in proteina. E' stato inoltre dimostrato che in lievito, nelle piante, e negli animali i miRNA sono in grado di indurre silenziamento trascrizionale mediante modificazioni del DNA e/o della cromatina (Noma et al, 2004). I miRNA riconoscono specificamente gli mRNA bersaglio in virtù di un appaiamento complementare delle basi. Tali RNA non sono perfettamente complementari tra loro (vi sono uno o più disappaiamenti) e, nella maggior parte dei casi, i miRNA provocano un blocco nella traduzione, senza causare la degradazione del mRNA bersaglio (Bartel, 2009).

Le prime evidenze dell'esistenza e del ruolo dei miRNA nella regolazione traduzionale furono osservate nei nematodi. In *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) furono identificati piccoli RNA in grado di ridurre la sintesi proteica senza modificare i livelli di accumulo di specifici mRNA. Il primo gene codificante per uno di questi piccoli RNA ad essere descritto, *lin-4*, è un regolatore essenziale della divisione cellulare allo stadio larvale. Esso da origine ad un corto RNA di 22 nucleotidi di lunghezza, perfettamente complementare ad un tratto della regione 3' non tradotta (3'UTR) dell'mRNA codificante per la proteina LIN-14, precedentemente dimostrata, tramite approccio genetico, essere controllata da *lin-4* (Lee R. et al., 1993). Attualmente sono stati individuati, mediante tecniche di clonazione tradizionale in associazione ad ausili bioinformatici, migliaia di miRNA in *C. elegans*, in *Drosophila melanogaster* ed anche nei mammiferi (Pasquinelli et al, 2000; Lagos-Quintana et al, 2002; Lee et al, 2002). Pertanto, attualmente i miRNA costituiscono la più grande classe di geni regolatori.

I miRNA attivi nella regolazione dei loro mRNA bersaglio sono definiti miRNA "maturi". Dati recenti riportano che circa il 50% dei geni per i miRNA si trova in regioni intergeniche, mentre il restante 50% risiede in sequenze introniche di specifici geni, definiti "ospite"

(Griffiths-Jones, 2007; Saini et al, 2008). I geni di miRNA sono dispersi in tutti i cromosomi umani eccetto che nel cromosoma Y.

La biogenesi dei miRNA ha inizio con la trascrizione di una breve sequenza genomica che dà origine ad un “microRNA primario” (pri-miRNA). Esso viene trascritto nel nucleo della cellula dalla RNA polimerasi II (RNAPol II) oppure, meno frequentemente, dalla RNA polimerasi III (RNAPol III; Borchert et al, 2006). I pri-miRNA, così come avviene per gli altri mRNA di classe II, subiscono modificazioni post-trascrizionali quali l’aggiunta del cappuccio di 7-metil-guanosina all’estremità 5’ e della coda di poli(A) all’estremità 3’ (Lee et al, 2002). La loro lunghezza può variare da qualche centinaia fino ad alcune migliaia di basi e possono contenere uno o più precursori dei miRNA (pre-miRNA) in forma policistronica. I pri-miRNA si ripiegano fino ad assumere una tipica struttura secondaria caratterizzata da diversi ripiegamenti a forcina (“stem-loop”), ognuno dei quali darà in seguito origine ad un miRNA diverso. L’evento di maturazione successivo avviene ad opera di un complesso multi proteico (*Microprocessor*) di cui fanno parte l’RNasi di tipo III Drosha e la proteina di legame all’RNA a doppio filamento DiGeorge syndrome critical region 8 gene DGCR8 (Landthaler et al, 2004). I pri-miRNA vengono riconosciuti da Drosha a livello dei ripiegamenti a forcina e tagliati alla base di tali strutture. Come risultato del taglio si ha la formazione dell’intermedio successivo, il pre-miRNA, della lunghezza di 60-70 nucleotidi e caratterizzato da una peculiare estremità di 2 nucleotidi a singolo filamento alle terminazioni 3’ (Lee et al, 2003). Questa estremità asimmetrica al 3’ è legata dalla proteina Esportina-5, che permette la traslocazione nel citoplasma del pre-miRNA (Lund et al, 2004; Zeng, 2006).

In *Drosophila* e nei mammiferi esistono anche vie non canoniche di processamento dei miRNA, che portano alla formazione di un pre-miRNA attraverso meccanismi indipendenti da Drosha. In genere, questi meccanismi riguardano miRNA localizzati in brevi introni (miRtrons), e sono trasportati nel citoplasma direttamente dopo lo splicing (Berezikov et al, 2007). Il pre-miRNA, traslocato nel citoplasma, viene riconosciuto a livello della protrusione al 3’ da un complesso multienzimatico con attività endonucleasica, chiamato Dicer, che completa la maturazione dei miRNA tagliandolo nella forma finale a doppio filamento di 22 nucleotidi con 2 nucleotidi sporgenti all’estremità 3’ (Meister e Tuschl, 2004). A questo punto i miRNA vengono incorporati nel complesso ribonucleoproteico dei miRNA (miRNP), noto anche come complesso silenziatore indotto da RNA (RISC). Quando il miRNA viene caricato sul RISC uno dei due filamenti viene allontanato e degradato. Il filamento che viene a far parte del RISC è in genere quello con l’estremità 5’ con energia libera minore (Schwarz et al, 2003). La

regolazione della produzione dei miRNA può avvenire durante tutti i passaggi della loro biogenesi.

Fin dalla loro scoperta, l'interesse per il ruolo rappresentato dai miRNA nella regolazione genica è cresciuto esponenzialmente. Numerosi dati sperimentali hanno dimostrato che i miRNA agiscono in numerosi processi cellulari, quali proliferazione, apoptosi e differenziamento, ed in processi fisiologici come il metabolismo, la cardiogenesi e lo sviluppo e funzione del sistema nervoso e immunitario (Ambros, 2004).

I miRNA possono avere profili di espressione specifici per stadi di sviluppo, tessuti e patologie; ciascun tessuto può così essere caratterizzato e distinto da uno specifico e distinto profilo di espressione di un gruppo di miRNA (Rana, 2007).

Il controllo dell'espressione genica avviene a livello post-trascrizionale, inducendo la degradazione di specifici mRNA oppure impedendo la traduzione della proteina. Il meccanismo d'azione che porta al silenziamento genico dipende dal grado di complementarità tra il miRNA e il suo mRNA bersaglio. Il grado di complementarità, che si limita ad una regione di 6-8 nucleotidi all'estremità 5' del miRNA detta "seed", è una caratteristica fondamentale per il destino dell'mRNA dopo il reclutamento del RISC. Una ridotta omologia di sequenza porta generalmente alla repressione traduzionale senza la degradazione dell'mRNA bersaglio, mentre se l'appaiamento alla regione 3'UTR degli mRNA bersaglio è perfetto, come nei miRNA delle piante o in alcuni miRNA animali, si verifica il taglio del messaggero, catalizzato dal complesso RISC reclutato dal miRNA stesso, che porta infine alla degradazione dell'mRNA bersaglio (Ambros, 2004).

Il meccanismo tramite cui RISC regola la traduzione è tutt'ora oggetto di attivo dibattito; a tal riguardo sono stati proposti tre modelli:

- la repressione dell'inizio della traduzione (Pillai et al, 2005);
- la repressione della fase di allungamento della traduzione (Maroney et al, 2006; Nottrott et al, 2006);
- la destabilizzazione del trascritto attraverso un accorciamento della coda di poli(A) (Wu et al, 2006).

Comunque il processo, qualora le informazioni di sequenza non siano sufficienti ad indirizzare il meccanismo regolatorio, può essere influenzato anche da altri fattori, quali la composizione proteica del RISC a cui è associato il miRNA, il pattern proteico a cui il miRNA è correlato o il promotore che guida la trascrizione del gene bersaglio (Filipowicz et al, 2008).

3.2 Predizione bioinformatica dei bersagli molecolari dei miRNA

Considerata la profonda implicazione dei miRNA in numerosi processi biologici, risulta importante l'identificazione dei geni regolati dai miRNA per comprendere il loro ruolo funzionale e le complesse reti molecolari alla base della regolazione genica. Nel corso degli anni, si è cercato di sviluppare algoritmi matematici per la predizione *in silico* di putativi mRNA bersaglio dei miRNA, con lo scopo di guidare la validazione sperimentale. Attualmente, però, un numero relativamente limitato di bersagli è stato confermato sperimentalmente (ossia veri positivi), ed è un numero persino più limitato quello dei miRNA di cui si conosce la non-interazione con un certo gene (ossia i veri negativi).

Gli algoritmi di predizione possono utilizzare i seguenti criteri:

- totale complementarità di allineamento tra il 3'UTR del putativo mRNA bersaglio e la "seed" (nucleotidi dalla posizione 2 alla posizione 7 nella regione 5' del miRNA);
- formazione di eteroduplex strutturalmente e termodinamicamente stabili tra il miRNA ed i suoi putativi "target" (si riconsidera l'energia libera associata a ciascun appaiamento tra le basi, prendendo in considerazione anche appaiamenti "insoliti", come G/U, se non comportano un'eccessiva destabilizzazione della struttura);
- conservazione nell'evoluzione di siti bersaglio dei miRNA. (Chang e Mendell, 2007).

Un limite di questi algoritmi nella predizione dei bersagli è l'individuazione dei falsi positivi. Inoltre, come sopra elencato, gli algoritmi presentano tra i criteri di identificazione la conservazione evolutiva dei siti bersaglio del miRNA, ma alcuni bersagli molecolari potrebbero non essere conservati tra le specie. È quindi molto difficile sviluppare algoritmi di predizione che usino un approccio d'apprendimento automatico e al tempo stesso dimostrino alta sensibilità e specificità; tuttavia si può migliorare la qualità delle predizioni attraverso l'uso combinato di due o più approcci computazionali (Sethupathy et al, 2006). Alcuni dei software disponibili in rete per la predizione dei putativi bersagli sono elencati nella **Tabella 2**.

I metodi di predizione attuali si differenziano sia nell'approccio utilizzato che nella performance, ma tutti necessitano di un miglioramento nella qualità delle predizioni. I primi algoritmi di predizione di "target" sviluppati sono RNAFold (Hofacker, 2003), TargetScan (Lewis et al, 2003) e Miranda (Enright et al, 2003), disponibili in rete dal 2003. Il software TargetScan combina la predizione di struttura (modeling) dell'eteroduplex miRNA-mRNA, basata sulla termodinamica, con un'analisi comparativa di sequenza, basata sulla conservazione

Programma	Sito Web	Referenza
DIANA-microT	http://www.diana.pcbi.upenn.edu/cgi-bin/micro_t.cgi	Bernstein et al., 2001
MicroInspector	http://mirna.imbb.forth.gr/microinspector/	Enright A et al. 2003
miRanda	http://www.microrna.org/	Doench et al.,2004;
MiRGator	http://genome.ewha.ac.kr/miRGator/	Cho et al., 2010
miTarget	http://cbit.snu.ac.kr/~miTarget/	Mathews D. et al.,1999
MirTarget2	http://mirdb.org/	Wang et al., 2008
NBmiRTar	http://wotan.wistar.upenn.edu/NBmiRTar/	Rusinov V., et al., 2005
PicTar	http://pictar.bio.nyu.edu/	John B et al., 2004
PITA	http://genie.weizmann.ac.il/	Miranda,K.C et al., 2006
RNA22	http://cbcsrv.watson.ibm.com/rna22.html	Lewis B et al., 2005
RNAhybrid	http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/	Lewis B et al., 2003
TarBase	http://diana.cslab.ece.ntua.gr/tarbase/	Papadopoulos et al., 2009
TargetScan	http://www.targetscan.org/	Hake S. et al.,2003;

Tabella 2. Elenco di alcuni software di predizione dei bersagli di microRNA, con i relativi siti web e le pubblicazioni di riferimento.

tra specie. Analisi condotte con TargetScan hanno indicato che oltre un terzo dei geni umani sono bersagli conservati di miRNA e quindi potenzialmente regolati da essi (Lewis et al, 2005). Il software miRanda fu inizialmente progettato per predire bersagli di miRNA in *D. melanogaster* (Enright et al, 2003) ed è basato su tre aspetti fondamentali:

- la determinazione di una sequenza che può essere legata da un miRNA;
- il calcolo della energia libera per la formazione dell'eteroduplex miRNA-mRNA;
- l'individuazione della conservazione evolutiva tra *D. melanogaster*, *D. pseudoobscura*, e *Anopheles gambiae*.

Lo stesso algoritmo è stato applicato anche alla predizione di target di miRNA umani. Circa 2000 geni bersaglio putativi umani di miRNA sono stati identificati, il che suggerisce che il 10% o più di tutti i geni umani sono regolati da miRNA. Come per TargetScan, i bersagli maggiormente rappresentati includevano fattori di trascrizione, proteine coinvolte nella traduzione, e componenti del complesso miRNA/ubiquitina, a supporto della possibile importanza dei miRNA nello sviluppo, nella morfogenesi e nelle funzioni del sistema nervoso. Una variante di miRanda, DIANAmicroT (Maragkakis et al, 2009) si basa principalmente sulle dimensioni di possibili anse a singolo filamento dovute ai disappaiamenti iniziali tra il miRNA e l'RNA messaggero. Altri programmi, come mirTarget (Kim et al, 2006) si basano sulla stabilità termodinamica della struttura formata dall'appaiamento tra il miRNA ed il possibile sito bersaglio, sulla complementarità di basi in specifiche posizioni e sui disappaiamenti. MirTarget, come MirTarget2 (Wang, 2008) e NBmiRTar (Kertesz et al, 2007), impiegano la tecnologia di apprendimento automatico (noto come "machine learning") per effettuare predizioni direttamente da "dataset" di bersagli di miRNA validati e raccolti dalla letteratura, per rendere la simulazione biologicamente rilevante.

Un'importante proprietà dei miRNA è la loro alta conservazione tra specie. Tale principio è utilizzato dai programmi come PicTar (Krek et al, 2005), che basano la loro predizione su dati comparativi di numerose specie per individuare "target" comuni per specifici miRNA. Inoltre, PicTar calcola la probabilità che una data sequenza dei bersagli sia legata da uno o più miRNA. L'algoritmo PicTar è stato utilizzato per la predizione dei bersagli di miRNA in vertebrati e suggerisce che, in media, circa 200 trascritti possono essere regolati da un singolo miRNA (Krek et al, 2005).

Numerosi studi hanno evidenziato che non esiste un algoritmo superiore agli altri (Sethupathy et al 2006; Bartel, 2009). Pertanto, la predizione dei "target" è in genere il risultato della intersezione di vari algoritmi (Megraw et al, 2007; Sonkoly et al, 2007).

La predizione bioinformatica dei bersagli di miRNA rappresenta certamente un primo importante approccio nello studio del ruolo funzionale dei miRNA stessi, ma i target predetti devono essere sempre validati da specifiche metodologie sperimentali. In merito a ciò sono state progettate banche dati che raccolgono le interazioni miRNA-bersaglio (MTI) validate sperimentalmente, come miRecords (Xiao et al, 2009) e TarBase (Papadopoulos et al, 2009). TarBase è il primo strumento di verifica dei MTI messo a punto. MiRecords, è composto da diverse sezioni, sia per la ricerca dei bersagli già validati, che per la predizione di mRNA ipoteticamente regolati da miRNA (Xiao et al, 2009). MiR2Disease riguarda la relazione che sussiste tra i miRNA, i bersagli genici e le patologie che interessano l'uomo (Jiang et al, 2009).

Generalmente gli esperimenti di validazione dell'interazione miRNA-mRNA implicano un iniziale approccio computazionale per l'individuazione dei siti bersaglio dei miRNA. Questa presunta interazione viene in seguito validata sperimentalmente, attraverso saggi dei geni reporter, western blotting, o esperimenti di microarray con la sovra-espressione o il silenziamento dei miRNA d'interesse. I saggi d'attività del gene reporter e il western blot sono indagini solitamente impiegate per confermare la connessione che sussiste tra miRNA e l'RNA messaggero. Inoltre, le analisi di Northern blotting, di PCR quantitativa o le ibridazioni *in situ*, sono spesso eseguite per esaminare la co-espressione del miRNA e del gene bersaglio. Sono stati messi a punto anche approcci d'analisi sull'intero genoma, come esperimenti di microarray modulando l'espressione dei miRNA di interesse. Inoltre, altre strategie si basano sulla proteomica quantitativa, per esaminare in modo esaustivo e globale i bersagli dei miRNA. Un esempio è dato dalla SILAC (*Stable Isotope Labelling with Aminoacid in Cell culture*), una tecnica che prevede la marcatura metabolica di proteine con amminoacidi arricchiti di isotopi pesanti in vivo in cellule cresciute in differenti condizioni (Blagoev et al, 2003), oppure l'impegno della pSILAC (Pulsed SILAC), una variante in cui gli amminoacidi marcati vengono posti nel mezzo di coltura per un tempo più breve, permettendo così il monitoraggio delle proteine *de novo* (Schwanhäusser et al, 2009). Un esempio di applicazione è rappresentato dall'analisi di tutti i geni bersaglio dei miRNA in cellule HeLa, realizzata sia per microarray che per pSILAC (Selbach et al, 2008).

3.3 I microRNA nell'ematopoiesi normale e patologica

3.3.1 MicroRNA nell'ematopoiesi normale

I miRNA sono espressi in modo dinamico durante tutta l'ematopoiesi, ed è ormai chiaro che questa classe di regolatori genici controlla il differenziamento e l'attività delle cellule emopoietiche (Havelange e Garzon, 2010).

Chen e collaboratori per primi identificarono un piccolo gruppo di miRNA (miR-181, miR-223 e miR-142) differenzialmente espresso nei tessuti ematopoietici murini (Chen et al, 2004). Da allora, numerosi altri studi hanno chiaramente evidenziato che i miRNA giocano ruoli importanti nel differenziamento ematopoietico. Studi recenti documentano il ruolo dei miRNA nell'ematopoiesi precoce, utilizzando miRNA arrays e predizioni *in silico* di mRNA bersaglio in cellule ematopoietiche CD34+. Ad esempio, i miR-17, -24, -146, -155, -128 e -181 sono stati identificati come regolatori del fenotipo dei progenitori staminali precoci, regolando

la transizione dei progenitori multi-potenti a progenitori mieloidi o linfoidi comuni (Georgantas et al, 2007). Fazi e collaboratori hanno riportato che il miR-223 è strettamente implicato nel differenziamento granulocitario: questo miR reprime l'espressione di NFI-A, un noto regolatore negativo dell'ematopoiesi, e promuove la granulocitopoiesi favorendo l'espressione di C/EBP α (Fazi et al, 2005). E' stato descritto che il gruppo di miRNA 17-5p, miR-20a e miR-106a è regolato negativamente durante la monocitopoiesi (Fontana et al, 2007). L'espressione di AML1, che è un bersaglio diretto di questi miRNA, viene in questo modo sbloccata promuovendo la maturazione monocitaria e sopprimendo ulteriormente l'espressione di questo gruppo di miRNA (Fontana et al, 2007). Il miR-221 e il miR-222 inibiscono la maturazione eritropoietica precoce reprimendo l'espressione del recettore di c-Kit. Il progressivo declino dell'espressione del miR-221 e del miR-222 consente un aumento d'espressione di c-Kit, e permette l'espansione clonale dei precursori eritropoietici (Felli et al, 2005). Nella megacariocitopoiesi, è stato riportato che il miR-150 regola negativamente c-Myb, un fattore di trascrizione con un ruolo importante nella maturazione dei megacariociti. I livelli di c-Myb scendono durante in differenziamento megacariocitario indotto dalla trombopoietina. E' stato dimostrato che la trombopoietina può attivare l'espressione del miR-150, che a sua volta reprime c-Myb consentendo il differenziamento megacariocitario (Barroga et al, 2008).

In **Figura 3** è mostrato uno schema che riassume i ruoli noti di numerosi miRNA coinvolti nell'ematopoiesi.

3.3.2 MicroRNA e leucemie

Considerata la profonda implicazione dei miRNA nell'ematopoiesi, non è sorprendente che un crescente numero di studi abbia descritto un loro ruolo nei disordini ematopoietici.

Nelle leucemie, e nei tumori in generale, i miRNA possono funzionare da oncogeni (onco-miR) attraverso vari meccanismi, e principalmente tramite l'eliminazione di proteine oncosoppressive, oppure avere un ruolo di oncosoppressori, bersagliando mRNA oncogenici. Le cause della deregolazione dell'espressione di specifici miRNA nello sviluppo tumorale non sono ancora del tutto note. La maggior parte dei geni che trascrivono per i miRNA risiede in particolari regioni genomiche conosciute come siti fragili, che nelle cellule cancerose sono spesso soggette ad alterazioni (Calin et al, 2004). Il ruolo dei miRNA nelle leucemie fu per la prima volta evidenziato dal gruppo di Calin nel 2002, il quale mostrò che pazienti affetti da una comune forma di leucemia, la leucemia linfocitica cronica delle cellule B

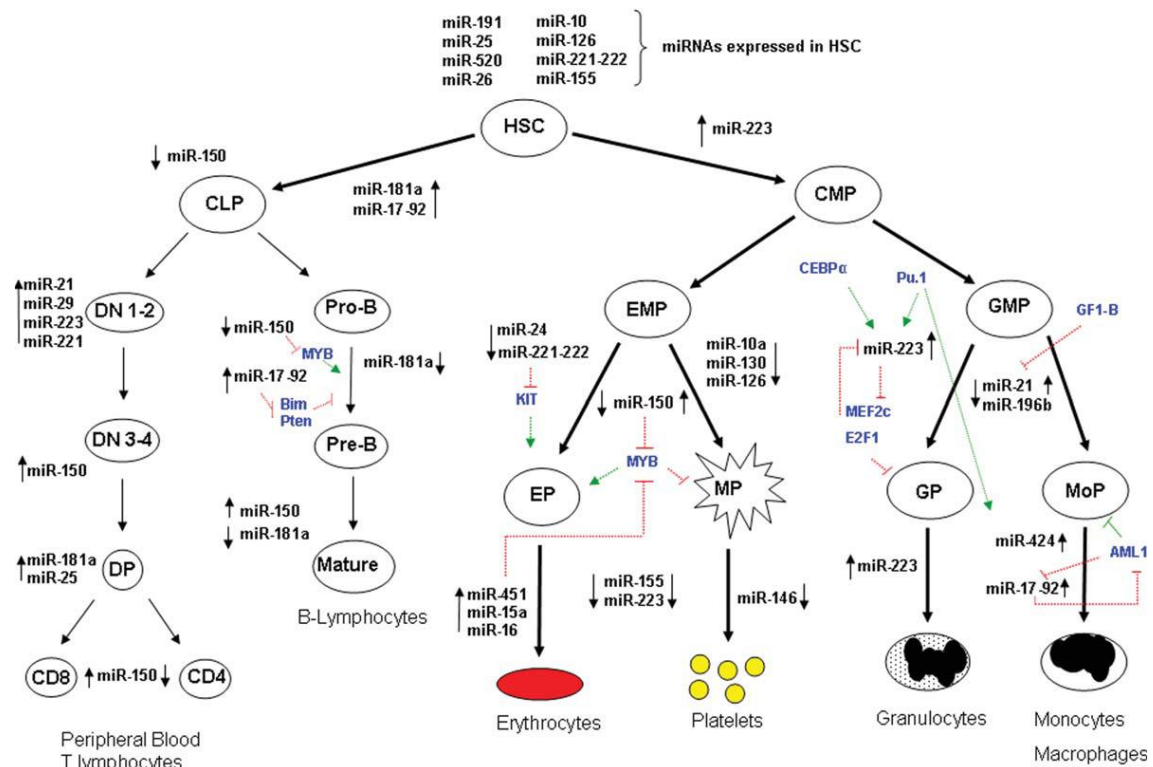


Figura 3. Livello di espressione e meccanismi regolatori dei miRNA nell’ematopoiesi. CLP, Progenitore linfoide comune; CMP, progenitore mieloide comune; DN, precursori di cellule T doppi negativi; DP, doppi positivi (cellule T CD4+, CD8+); EMP, precursore eritrocita-megacariocitario; EP, precursore eritrocitario; GMP, precursore granulocito-monocitario; GP, precursore granulocitario; HSC, cellula staminale ematopoietica; MP, precursore megacariocitario. Le frecce verdi indicano una regolazione positiva, le frecce rosse una regolazione negativa. I bersagli dei miRNA o i fattori coinvolti nella regolazione dei miRNA sono in blu (da Havelange e Garzon, 2010).

(LCL), presentavano frequentemente delezioni o silenziamenti del cluster intronico di microRNA comprendente miR-15a e miR-16-1 (Calin et al, 2002).

Il locus (13q14) dove mappano questi due miRNA risulta essere deletato in più del 65% dei casi di LCL, come nel 16-40% dei mielomi multipli e nel 60% dei carcinomi prostatici. In un altro studio, è stato dimostrato che il miR-15a e il miR-16-1 regolano in maniera negativa il gene anti-apoptotico *Bcl2*, la cui iper-espressione è stata riscontrata in molti tipi di cancro, incluse le leucemie ed i linfomi (Cimmino et al, 2005). Il miR-155 rappresenta un classico esempio di onco-miR nelle leucemie: l’espressione aberrante di questo miRNA è stata riscontrata in specifici sottogruppi di LAM (Garzon et al, 2008a; Garzon et al, 2008b), e l’espressione

forzata del miR-155 in HSC murine causa mielo-proliferazione, splenomegalia e cambiamenti displastici (O'Connel et al, 2008). Al contrario, il miR-223 potrebbe avere funzioni oncosoppressorie, almeno in alcuni sottotipi di LAM: è stato dimostrato che AML1/ETO reprime l'espressione del miR-223 tramite silenziamento epigenetico, e l'espressione ectopica di questo miR in cellule di LAM è in grado di promuovere il differenziamento granulocitario (Fazi et al, 2007).

La grande variabilità nel decorso ed esito della malattia nei pazienti di LAM, anche all'interno di sottogruppi definiti a livello morfologico o citogenetico, ha suggerito la possibilità che l'espressione di gruppi specifici di miRNA possa essere associata a particolari sotto-tipi di leucemia e avere un significato prognostico. A questo scopo, Isken e collaboratori hanno analizzato 50 casi di pazienti LAM e 12 campioni di controllo per l'espressione di 154 miRNA umani. Questo studio riporta una significativa differenza di espressione dei miR-23b, miR-34a, miR-221 e miR-222 nelle cellule di LAM rispetto a precursori CD34+. Eccetto che per il miR-23b, tutti questi miR erano iper-espressi nelle LAM rispetto ai controlli. Inoltre, l'espressione del miR-181a era ridotta nei pazienti FAB M4 e M5, se confrontata a quella dei pazienti M1 e M2 (Isken et al, 2008). Specifici profili di espressione di miRNA possono consentire di discriminare le LAM dalle LAL, come è stato mostrato da uno studio di Mi e collaboratori, nel quale sono stati identificati 27 miRNA espressi differenzialmente tra LAL e LAM (Mi et al, 2007). Tra questi miRNA, i miR-128a, 128b, 223, e let-7b potevano distinguere le LAL dalle LAM con un'accuratezza diagnostica del 97-99%. Garzon e collaboratori hanno analizzato l'espressione di miRNA in cellule di LAP nel differenziamento granulocitario indotto da ATRA (Garzon et al, 2007). In questo studio, il trattamento con ATRA nella linea cellulare di LAP NB4 induceva una diminuita espressione del miR-181b e un aumento di espressione dei miR-15a, -15b, -16, -107, -223, -342, let-7a, let-7c e let-7d, suggerendo per questi ultimi una possibile funzione di oncosoppressori (Garzon et al, 2007). Il nostro gruppo di ricerca ha recentemente confermato ed esteso questi risultati *in vivo* in blasti primari di LAP (Careccia et al, 2009). In questo lavoro, campioni derivati da pazienti LAP, trattati con successo con terapie a base di chemioterapici e ATRA, mostravano una diminuita espressione del miR-181b, e un'aumentata espressione dei miR-15b, -16, -107, -223, -342 e let-7c. Inoltre, è stato identificato uno specifico profilo di espressione di un ristretto gruppo di miRNA che distingueva i blasti LAP dai promielociti normali. In particolare, l'espressione del miR-342 e del let-7c risultavano significativamente ridotte nei blasti leucemici rispetto a promielociti normali differenziati *in vitro* da progenitori CD34+. Abbiamo dimostrato che, in cellule di LAP, i promotori di questi due miRNA erano bersaglio dell'oncoproteina PML/RAR α e, in

risposta al trattamento con ATRA, l'aumentata espressione del miR-342 e del let-7c era associata al distacco di PML/RAR α dai loro promotori (Careccia et al, 2009). Questi risultati suggerivano che specifici profili di espressione di miRNA potevano distinguere le cellule di LAP dai promielociti normali, e che la repressione trascrizionale dei miR-342 e let-7c ad opera dell'oncoproteina PML/RAR α poteva rappresentare un evento importante nella leuchemiogenesi delle LAP.

3.4 La famiglia di micro-RNA let-7

3.4.1 Aspetti generali sulla famiglia let-7

Particolare attenzione, per l'argomento di questo lavoro di tesi, ha il microRNA let-7c, appartenente alla famiglia di miRNA let-7.

Il gene lethal (let-7) fu inizialmente scoperto come un gene essenziale per lo sviluppo in *C.elegans*, e fu uno dei primi miRNA identificati (Reinhart et al, 2000). Oggi, è noto che esiste in realtà una famiglia di miRNA let-7 altamente conservata nelle specie animali, e spesso presente in copie multiple nel genoma (**Tabella 3**). Per distinguere tra le diverse isoforme, una lettera posta dopo let-7 distingue i diversi componenti della famiglia, che differiscono leggermente nella sequenza del miR maturo. Un numero posto alla fine del nome può indicare che la stessa sequenza è presente in copie multiple nel genoma. Ad esempio, nell'uomo esistono 10 sequenze mature di let-7, e 13 loci genici. Tre precursori diversi codificano per lo stesso let-7a maturo (let-7a-1, let-7a-2, let-7a-3), e precursori di due loci genici diversi producono il let-7f (let-7f-1 e let-7f-2).

In *C.elegans*, il let-7 rappresenta il miRNA “fondatore” della famiglia let-7, ed è un gene con funzioni eterocroniche (geni le cui mutazioni causano trasformazioni fatali allo sviluppo temporale della cellula). Durante gli stadi larvali dello sviluppo di *C.elegans*, le cellule dell'ipodermide, conosciute come cellule di giunzione (“seam cells”), si dividono in modo analogo alle cellule staminali, con una cellula figlia che differenzia e l'altra che mantiene le proprietà auto-rinnovanti e continua il programma proliferativo. Alla transizione tra stadio larvale L4 e adulto, la cellula figlia auto-rinnovante cessa di proliferare e differenzia. Cellule di giunzione mutanti con perdita di funzione per let-7, falliscono nell'uscire dal ciclo cellulare a questo stadio, e subiscono divisioni cellulari extra (Reinhart et al, 2000). La maggioranza degli animali con perdita di funzione per let-7 muore a causa di questi difetti nello sviluppo, e il mutante nullo è stato perciò definito lethal (let). Il ruolo cruciale ricoperto da let-7 nello

	<i>C. elegans</i> (nematode) ^b	<i>D. melanogaster</i> (fly)	<i>D. rerio</i> (zebrafish)	<i>G. gallus</i> (chicken)	<i>H. sapiens</i> (human)	<i>M. musculus</i> (mouse)	<i>X. tropicalis</i> (frog)
<i>let-7a</i>	1	1	6	4 ^c	3	2	1
<i>let-7b</i>	–	–	1	1	1	1	1
<i>let-7c</i>	–	–	2	1	1	2	1
<i>let-7d</i> ^d	–	–	2	1	1	1	–
<i>let-7e</i> ^e	–	–	1 ^f	–	1	1	2
<i>let-7f</i>	–	–	1	1	2	2	1
<i>let-7g</i> ^g	–	–	2	1	1	1	1 ^h
<i>let-7h</i>	–	–	1	–	–	–	–
<i>let-7i</i>	–	–	1	1	1	1	1
<i>let-7j</i>	–	–	1 ^h	1 ^c	–	–	–
<i>let-7k</i>	–	–	–	1 ⁱ	–	–	–
<i>mir-98</i>	–	–	–	–	1	1	1
<i>mir-202</i> ^l	–	–	1	1	1	2	1
Cluster 1	–	1	4	1	3	3	2
Cluster 2	–	–	– ^j	1	1	1	–
Cluster 3	–	–	1	1	1	– ^k	–
Cluster 4	–	–	–	–	1	1	1

Tabella 3. Organizzazione schematica dei membri di *let-7* nelle diverse specie. I numeri nella tabella rappresentano il numero di copie annotate in mirBase (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>). Il Cluster 1 è costituito dal miR-100, 99, *let-7*, e miR-125; il Cluster 2 è rappresentato dal *let-7a*, d e *let-7f*. Il Cluster 3 è composto dal *let-7a-3* e *let-7b*, mentre il Cluster 4 è composto dal *let-7f* e miR-98 (da Roush e Slack, 2008).

sviluppo di *C.elegans* è suggerito anche dalla sua espressione strettamente regolata nel tempo, che comincia ad essere rilevata allo stadio L3, e raggiunge il suo picco massimo durante lo stadio L4, in accordo con il suo ruolo nel promuovere l'uscita dal ciclo cellulare e il differenziamento terminale delle cellule di giunzione alla fine dello stadio larvale L4 (Esquela-Kersher et al, 2005).

Sebbene molte caratteristiche dei miRNA *let-7* sembrino altamente conservate nelle specie, esistono anche differenze cospicue passando da *C.elegans* agli organismi più complessi. Ad esempio, il numero dei membri della famiglia è maggiore nei vertebrati, e la sola sequenza matura del *let-7a* è identica tra tutte le specie animali, dal *C.elegans* all'uomo. Gli altri membri hanno identica “seed”, ma differiscono in varia misura nei nucleotidi rimanenti (Roush e Slack, 2008). Anche i meccanismi regolatori dell'espressione temporale di *let-7* possono differire tra invertebrati e organismi superiori. Alcuni studi hanno mostrato che negli eucarioti inferiori, come in *C.elegans* e *Drosophila*, la regolazione avviene a livello della trascrizione del pri-*let-7* (Sempere et al, 2002; Johnson et al, 2003), mentre nei mammiferi intervengono meccanismi più complessi, e la regolazione può avvenire sia a livello trascrizionale che post-trascrizionale (Newman et al, 2008; Viswanathan et al, 2008).

Ad ogni modo, la comparsa di let-7 maturo negli stadi avanzati dell'embriogenesi è una caratteristica conservata in molti organismi, come nel tessuto cerebrale di topo e *Danio rerio* (Lagos-Quintana et al, 2002; Wulczyn et al, 2007). In contrasto con la loro espressione nei tessuti differenziati, forme mature di let-7 sono assenti in cellule staminali embrionali umane e murine, e un tema comune sembra un loro aumento di espressione in seguito al differenziamento (Lagos-Quintana et al, 2002; Sempere et al, 2004; Mineno et al, 2006; Wulczyn et al, 2007), rispecchiando l'espressione di let-7 nelle cellule di giunzione differenzianti di *C.elegans*. In effetti, una delle funzioni principali del let-7 sembra quella di promuovere il differenziamento cellulare: l'espressione del let-7a, let-7c e let-7e maturi è aumentata durante lo sviluppo cerebrale di topo (Wulczyn et al, 2007), e in un altro studio il let-7 è stato trovato espresso in progenitori cellulari di tessuto mammario avviati al differenziamento (Ibarra et al, 2007). Un'altra funzione della famiglia let-7 è il controllo del ciclo cellulare: la perdita di let-7 in *C.elegans* e *Drosophila* conduce ad una iper-proliferazione cellulare (Reinhart et al, 2000; Caygill e Johnston, 2008) e, allo stesso modo, il blocco d'espressione di let-7 nella linea di carcinoma polmonare umana A549 induce un'aumentata proliferazione, mentre la sua iper-espressione blocca la progressione del ciclo cellulare (Johnson et al, 2007). Alcuni studi suggeriscono che bassi livelli di let-7 potrebbero essere usati come una caratteristica diagnostica di certe popolazioni di cellule staminali: ad esempio, una bassa espressione di let-7c è stata usata per arricchire le cellule staminali in una linea di epitelio mammario murino Comma-D β , mentre un'iper-espressione di let-7c riduceva la sottopopolazione delle cellule auto-rinnovanti (Ibarra et al, 2007).

Presi assieme, questi dati suggeriscono che la regolazione del differenziamento e della proliferazione cellulare sono funzioni conservate della famiglia let-7 lungo l'evoluzione delle specie. Tuttavia, sebbene i miRNA della famiglia let-7 abbiano caratteristici pattern di espressione temporali durante lo sviluppo, un ruolo diretto del let-7 nello sviluppo dei vertebrati non è stato ad oggi chiaramente dimostrato. Il ritardo nell'identificazione di queste funzioni è probabilmente dovuto alle difficoltà associate al silenziamento dei molteplici membri della famiglia nello stesso animale, e alla possibile ridondanza dei membri di una famiglia così numerosa (Roush e Slack, 2008).

3.4.2 Let-7 e tumori

Le proprietà di de-differenziamento e di aumento della proliferazione appena descritte, sono anche caratteristiche tipiche delle cellule tumorali. In effetti, la ridotta espressione di vari membri della famiglia let-7 è stata associata a molti tumori umani (Büssing et al, 2008) e alle

cellule staminali tumorali (Yu et al, 2007), suggerendo fortemente un ruolo di questi miRNA come oncosoppressori nei tumori umani. In particolare, l'espressione dei miRNA let-7 è stata trovata ridotta in linee cellulari e tessuti primari di carcinoma polmonare (Takamizawa et al, 2004; Johnson et al, 2007) e, in pazienti affetti da carcinoma polmonare a cellule non piccole, bassi livelli di pri-let-7 sono associati a cattiva prognosi (Takamizawa et al, 2004). Questi dati sono in accordo con l'osservazione che diversi membri della famiglia let-7 mappano su siti cromosomici frequentemente deleti nei tumori polmonari (Calin et al, 2004). Potenziali meccanismi molecolari di una funzione oncosoppressoria dei miRNA let-7 emergono da diversi studi, nei quali è stato riportato che let-7 regola numerosi oncogeni. E' stato dimostrato che K-RAS e N-RAS sono bersagli molecolari di let-7, suggerendo che questi miRNA possano funzionare da oncosoppressori nei carcinomi polmonari sopprimendo *in vivo* l'espressione di RAS (Johnson et al, 2005). Un altro bersaglio molecolare di let-7 è l'oncogene MYC, sebbene la rilevanza *in vivo* di questa interazione debba essere ancora completamente chiarita (Leucci et al, 2008). Il cluster altamente conservato del let-7a, let-7d e let-7f può essere coinvolto nei linfomi a cellule B, poiché sembra esser regolato direttamente dall'oncogene v-myc (v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog). E' stato dimostrato che let-7a reprime l'espressione di MYC nel linfoma di Burkitt, suggerendo l'esistenza di un circuito a "feedback" negativo (Sampson et al, 2007; Chang et al, 2008). Numerosi gruppi hanno riportato che un altro importante oncogene, HMGA2, è regolato negativamente da membri della famiglia let-7 (Lee e Dutta, 2007; Mayr et al, 2007). Nei tumori le mutazioni di HMGA2 frequentemente causano delezioni del 3' UTR, portando all'eliminazione dei siti di legame per let-7, e alla iper-espressione della proteina HMGA2 che promuove il cancro (Mayr et al, 2007). Numerosi lavori hanno identificato altri bersagli dei miRNA let-7 che supportano la potenziale rilevanza di questa famiglia di miRNA nel controllo del ciclo cellulare in cellule tumorali: CDC25a e CDK6, due regolatori fondamentali nella progressione del ciclo cellulare, si sono rivelati bersagli diretti di let-7 (Johnson et al, 2007), così come la ciclina D1 (Schultz et al, 2008).

Di notevole interesse, alcuni studi recenti riportano che due proteine in grado di legare l'RNA, Lin28 e Lin28B, sono in grado di bloccare il corretto processamento e maturazione dei precursori della famiglia let-7, suggerendo che l'aberrante aumento di espressione di Lin28 e Lin28B, frequentemente riscontrata nei tumori umani, possa promuovere la tumorigenesi tramite la repressione di let-7. La proteina LIN28 è espressa negli stadi precoci dello sviluppo embrionale in cellule staminali indifferenziate, mentre Lin28B è espressa nei testicoli, placenta e nel fegato fetale (Guo et al, 2006; Polesskaya et al, 2007). La proteina Lin28 lega il trascritto primario e il precursore a forcina del microRNA (pri-let-7 e pre-let-7) inibendo il taglio da

parte di Drosha. Lin28 è in grado anche di promuovere l'uridilazione terminale del pre-let-7, mediante una uridil-transferasi 3'terminale, determinando la degradazione del trascritto. Questo indica che Lin28 inibisce la processazione attuata da Dicer (Viswanathan et al, 2008; Viswanathan and Daley, 2010). Inoltre, il ripristino dell'espressione di let-7 in cellule di leucemia mieloide cronica K-562 mediante inibizione dell'espressione di Lin28, diminuisce la capacità proliferativa e quella di formare colonie in soft agar, e stimola modificazioni morfologiche indicative di un'induzione del differenziamento (Newman et al, 2008; Viswanathan et al, 2008; Viswanathan et al, 2009).

Nonostante la ridotta espressione dei membri della famiglia let-7 sia stata generalmente associata ad un aumento della capacità trasformante *in vitro* in vari tipi tumorali, alcuni dati contrastanti in vari tipi di cancro suggeriscono che la funzione della famiglia let-7 non sia ancora completamente chiarita, e che singoli membri della famiglia let-7 possano avere ruoli distinti. E' possibile infatti che i 13 loci genici di let-7 nell'uomo non esistano semplicemente per avere diverse funzioni nei vari tessuti, ma potrebbero avere differenti funzioni nella stessa cellula. Alcuni lavori riportano che in certi tumori alcune specie let-7 sono sovra-esprese mentre altre sono perse. Ad esempio, in uno studio sul mesotelioma maligno, è stato trovato iper-espresso il let-7b, mentre l'espressione del let-7g era fortemente ridotta (Guled et al, 2009).

Per quanto riguarda il let-7c, particolarmente importante per il lavoro di questa tesi, è un miRNA intronico localizzato nel sesto introne del gene C21orf34 α , ed è espresso ubiquitariamente in tessuti murini ed umani (Ro et al, 2007). Let-7c presenta funzioni oncosoppressive che correlano con il suo coinvolgimento nella carcinogenesi (Shell et al, 2007). Sono stati individuati un set di LOG (let-7-regulated oncofetal genes) sovra-regolati in molti carcinomi umani, mentre l'RNA di tali geni è ipo-regolato (Boyerinas et al, 2008). Questa attività di oncosoppressore è stata riportata anche in modelli di tumore della prostata e del polmone. In particolare, nei carcinomi polmonari la modulazione dell'espressione del let-7c è strettamente correlata a quella dell'oncogene RAS, la cui attivazione è un evento cruciale per l'insorgenza della neoplasia (Johnson et al, 2005; Ozen et al, 2008). Il let-7c è stato mostrato essere anche direttamente implicato nell'epatocarcinoma, essendo la sua espressione diminuita durante la progressione di questo tumore (Pineau et al, 2010).

E' interessante considerare che, nei tumori ematopoietici, il let-7c è regolato negativamente in pazienti di LAM con t(8;21), inv(16) e con Linfoma di Burkitt (Jongen-Lavrencic et al, 2008; Leucci et al, 2008). In questo studio, è stata valutata l'espressione di 260 miRNA in 215 casi LAM di nuova diagnosi, appartenenti a diversi gruppi citogenetici. Una ridotta espressione di

let-7b e let-7c consentiva di discriminare le LAM con t(8;21) e inv(16) dagli altri gruppi definiti a livello molecolare, suggerendo un potenziale ruolo onco-soppressivo di let-7b e let-7c in questi sottotipi di leucemia.

In conclusione, la funzione della famiglia di miRNA let-7 come oncosoppressore in molti tipi di cancro, incluse le leucemie, rende estremamente importante sia la comprensione di come i vari membri let-7 vengano regolati, che l'ulteriore definizione di quali siano i loro bersagli nella tumorigenesi e i meccanismi molecolari nei quali sono implicati. E' possibile infatti che la dettagliata comprensione di questi meccanismi possa condurre allo sviluppo di nuove terapie contro il cancro.

Obiettivi della ricerca

La leucemia mieloide acuta rappresenta un gruppo eterogeneo di disordini ematopoietici, caratterizzati da distinte lesioni genetiche. A causa delle mutazioni accumulate, i blasti leucemici manifestano un'alterata capacità proliferativa e/o sono incapaci di maturare in cellule terminalmente differenziate (Steffen et al, 2005).

I microRNA, una classe di piccoli RNA non codificanti che regolano l'espressione genica a livello post-trascrizionale (Bartel, 2009), controllano numerosi processi biologici fondamentali, come la proliferazione, l'apoptosi e il differenziamento, e la loro attività aberrante può giocare un ruolo anche nella trasformazione neoplastica (Calin e Croce, 2006). Alcuni miRNA sono differenzialmente espressi nei tessuti ematopoietici e possono avere un ruolo importante come regolatori del normale differenziamento ematopoietico e nelle leucemie (Havelange e Garzon, 2010).

Recentemente, abbiamo dimostrato che un ridotto gruppo di miRNA, associati al differenziamento ematopoietico, è differenzialmente espresso in blasti di leucemia promielocitica acuta *in vivo* e modulato dal trattamento differenziante con ATRA. In particolare, abbiamo identificato il let-7c come uno dei miRNA la cui espressione è diminuita nei blasti LAP rispetto a promielociti normali differenziati *in vitro* (Careccia et al, 2009). Inoltre, abbiamo dimostrato che in cellule di LAP il let-7c è un bersaglio del repressore trascrizionale PML/RAR α e, in seguito a trattamento con ATRA, la rimozione di PML/RAR α dal promotore del let-7c è associato ad un aumento di espressione del miRNA (Careccia et al, 2009).

Il let-7c appartiene alla famiglia let-7 di miRNA, che ha ruoli importanti nello sviluppo e nel differenziamento, e potenzialmente coinvolta con ruoli di oncosoppressore in diversi tipi di cancro (Büssing et al, 2008). Il fatto che il let-7c sia represso dall'oncoproteina PML/RAR α nella LAP, e che la sua espressione sia aumentata a seguito del trattamento differenziante con ATRA sia *in vitro* che *in vivo* (Garzon et al, 2007; Careccia et al, 2009), suggerisce un possibile significato funzionale di questo miRNA nella patogenesi della LAP e/o nella risposta differenziativa all'ATRA. Inoltre, il let-7c è stato trovato ipo-espresso anche in pazienti di LAM con t(8;21) e inv(16) (Jongen-Lavrencic et al, 2008), suggerendo un suo ruolo potenziale anche in altri sottotipi di LAM. Sulla base di questi dati, lo scopo di questa ricerca è quello di valutare il possibile ruolo funzionale del let-7c in cellule di LAM, e di identificare nuovi possibili bersagli molecolari di let-7c coinvolti nella patogenesi di questa malattia.

Materiali e Metodi

Linee cellulari e condizioni di coltura

La linea cellulare leucemica NB4 è stata stabilita dal midollo osseo di una donna di 23 anni con leucemia promielocitica acuta (LAP, FAB M3). La linea leucemica HL-60 è stata stabilita da sangue periferico di una donna di 35 anni con leucemia mieloide acuta (LAM, FAB M2). La linea monoblastica U937 è stata isolata da un uomo di 37 anni con linfoma istiocitico diffuso. Tutte le linee sono state cresciute in terreno di coltura RPMI + Glutamax (Gibco, Life Technologies) contenente il 10% di siero bovino fetale (FBS) inattivato per 1 ora a 56 °C (Hyclone, Perbio, Logan, Utah), e 1% di penicillina-streptomicina (Cambrex Bio-Science, Verviers, Belgio). Le cellule, che crescono in sospensione, sono state piastrate ad una concentrazione compresa tra $0,1-1 \times 10^6$ cellule/mL. La linea cellulare embrionale umana di rene 293T è stata cresciuta in terreno di coltura DMEM + Glutamax (Gibco, Life Technologies) contenente il 10% di FBS inattivato per 1 ora a 56 °C (Cambrex Bio-Science, Verviers, Belgio) e 1% di penicillina-streptomicina (Cambrex Bio-Science, Verviers, Belgio). Tutte le linee sono state coltivate alla temperatura di 37 °C, in atmosfera con 5% di CO₂ e umidità al 90%.

Blasti primari derivati da pazienti

I blasti leucemici analizzati in questo lavoro sono stati ottenuti da prelievi di midollo osseo, e successiva purificazione, effettuati alla diagnosi su 3 pazienti di LAM a cariotipo normale. Per tutti i pazienti è stato ottenuto il consenso informato. I blasti purificati, con la loro caratterizzazione morfologica e molecolare, sono stati gentilmente forniti dal Dipartimento di Biopatologia e Diagnostica dell'Università di Roma "Tor Vergata".

I blasti sono stati cresciuti alla densità di 0,5-1 milione cellule/mL in RPMI + Glutamax (Gibco, Life Technologies), 10% FBS (Hyclone, Perbio, Logan, Utah), 50 ng/mL FLT3 ligand, 50 ng/mL SCF 50 ng/mL, GM-CSF 1 pg/mL (PeproTech, Londra, UK), 1% di penicillina-streptomicina (Cambrex Bio-Science, Verviers, Belgio).

Cellule ematopoietiche normali

Il sistema di differenziamento granulocitario *in vitro* ci è stato gentilmente fornito dal Dipartimento di Ematologia dell'Istituto Superiore di Sanità. I progenitori emopoietici normali CD34+ sono stati ottenuti e purificati da sangue di cordone ombelicale umano, e

indotti a differenziare *in vitro* verso la linea granulocitaria utilizzando un cocktail di citochine ematopoietiche (IL-3 1 unità/mL; GM-CSF 0,1 ng/mL; G-CSF in quantità saturanti, 500 unità/mL). Nel testo sono indicate come “normali” cellule corrispondenti ai vari stadi della maturazione granulocitaria indotta *in vitro*.

Trattamenti

Le NB4, HL-60 e U-937 sono state trattate con acido retinoico tutto-*trans* (ATRA; Sigma, St Louis, MO) 1 µM per vari tempi. Per l'induzione al differenziamento monocitario, le HL-60 sono state trattate con 12-O-tetradecanoilforbolo-13-acetato (TPA; Sigma, St Louis, MO) 50 nM per 48 ore. Le NB4 sono state trattate con una combinazione di TPA 200 nM e 1,25-diidrossi-vitamina D3 (VD3; Sigma, St Louis, MO) 200 nM per 72 ore, come descritto in Bhatia et al, 1996.

Reagenti di trasfezione

Per gli esperimenti di iper-espressione del let-7c, le linee cellulari sono state trasfettate con un RNA sintetico a doppio filamento modificato chimicamente, di sequenza identica al let-7c umano maturo (miRIDIAN® mimic hsa-let-7c, Dharmacon, Chicago, IL). Come controllo negativo, è stato usato un mimic sintetico analogo, con omologia di sequenza minima con i microRNA umani (miRIDIAN® mimics Negative control #2, Dharmacon). Per inibire l'espressione del let-7c endogeno, le cellule sono state trasfettate con un RNA sintetico modificato chimicamente (*Locked Nucleic Acid*, LNA™) di sequenza complementare al let-7c maturo, (miRCURY LNA™ microRNA inhibitor, Exiqon); come controllo negativo è stato usato un RNA sintetico chimicamente analogo, privo di omologia verso ogni microRNA e mRNA umano (miRCURY LNA™ Inhibitor Negative Control, Exiqon, Woburn, MA). Nel testo e in **Figura 9** sono indicati come antago-miR (antago-let-7c e antago-ctrl). Negli esperimenti di silenziamento di Pbx2, le cellule sono state trasfettate con una soluzione di 4 piccoli RNA duplex sintetici (siRNA), tutti diretti contro l'mRNA umano di Pbx2 (ON-TARGETplus SMARTpool™ Dharmacon). Come controllo negativo, è stato usato un *pool* di siRNA con effetti *off-target* minimi verso i geni umani (ON-TARGETplus Non-targeting pool, Dharmacon).

Trasfezioni

Le linee leucemiche NB4, HL-60 e U-937 sono state trasfettate mediante elettroporazione con Nucleofector 4D system (Lonza, Walkersville, MD, USA). Per ogni campione, $2-4 \times 10^6$ cellule/cuvetta sono state centrifugate a 200 g a temperatura ambiente (RT) per 10'. I pellet sono stati risospesi in 100 μ L di buffer di elettroporazione SF + Supplement 1 (Lonza) e trasferiti in cuvetta. In tutti gli esperimenti, sono stati impiegati 60 pmol/cuvetta di mimics o siRNA. I programmi di elettroporazione usati, selezionati per ogni linea come i migliori a seguito di protocolli di ottimizzazione, sono stati: EH-100 (per NB4), EN-138 (per HL-60), EP-100 (per U937). Dopo l'elettroporazione, le cellule sono state incubate per 10' a RT, poi piastrate alla densità di 1 milione cellule/mL in terreno senza antibiotici. Dopo 16-24 ore, è stato fatto un cambio di terreno, e le cellule sono state piastrate in terreno completo alla densità di 0,1-0,2 milioni/mL. L'efficienza di trasfezione è stata verificata, per ogni linea, elettroporando le cellule in cuvetta alle medesime condizioni con 2 μ g di plasmide pmaxGFP® (Lonza), e misurando la percentuale di cellule GFP-positive a 24 ore dalla trasfezione, tramite FACS o conta al microscopio. Nei vari esperimenti, l'efficienza di trasfezione è stata del 59% \pm 5% nelle NB4, 40% \pm 5% nelle HL-60, 65% \pm 8% nelle U937.

Le cellule ematopoietiche normali e la linea cellulare 293T sono state trasfettate con Lipofectamine® 2000, secondo il protocollo fornito dalla ditta (Invitrogen).

Costruzione dei plasmidi lentivirali, produzione di lentivirus e infezione

Per la costruzione del vettore lentivirale esprimente let-7c, è stato generato un costrutto d'espressione clonando un frammento del pri-let-7c (dalla posizione -68 a +146 rispetto al termine 5' del pre-let-7c) usando i siti *Bgl*II e *Xho*I del plasmide pSP65-U1 (Denti et al, 2004). La cassetta di espressione U1-let-7c è stata quindi sub-clonata nel sito *Eco*RV del vettore lentivirale pRRSIN.cPPT.PGK-GFP.WPRE. Come controllo negativo è stato utilizzato il vettore lentivirale vuoto (*mock*).

Particelle virali infettive sono state prodotte nella linea recipiente 293T. Le cellule sono state piastrate 24 ore prima della trasfezione in terreno senza antibiotici. I vettori lentivirali sono stati co-trasfettati con il sistema di packaging di terza generazione ViraPower™ (Invitrogen), usando il reagente di trasfezione Fugene®6, seguendo il protocollo fornito dalla ditta (Roche Diagnostic). Dopo 72 ore, è stato raccolto il supernatante, centrifugato e filtrato. Il titolo lentivirale è stato determinato misurando la percentuale di cellule GFP-positive dopo infezione delle 293T con diluizioni seriali del supernatante.

Per le infezioni, i blasti leucemici primari e la linea cellulare NB4 sono stati centrifugati a 200g

per 5' a +4°C, e i pellet risospesi in una soluzione contenente RPMI completo, virus e polibrene 8 µg/mL. Dopo 16 ore di incubazione a +37°C, le cellule sono state lavate in PBS e risospese in terreno completo. Negli esperimenti di questa tesi, le cellule sono state infettate con una *Multiplicity of Infection* (MOI) 10.

Analisi immunofenotipica

Negli esperimenti del presente lavoro, 5×10^4 cellule per ogni punto sono state lavate due volte in PBS freddo, risospese in 50 µL di PBS+FBS 20% e incubato 10' in ghiaccio. Ogni campione è stato poi incubato al buio per 30' a +4 °C con un anticorpo diluito 1:10, diretto contro l'antigene di membrana studiato. Gli anticorpi impiegati in questi esperimenti sono state IgG1 monoclonali di topo coniugate con R-Ficoeritrina (PE), fluorocromo che viene eccitato a 488nm ed ha un picco d'emissione 575 nm, e dirette contro l'antigene umano CD11b (BD Biosciences Pharmingen). Come controllo negativo, abbiamo incubato le cellule alle stesse condizioni con una IgG PE non reattiva di topo dello stesso isotipo (BD Biosciences Pharmingen). Dopo l'incubazione, ai campioni sono stati aggiunti 500 µL di PBS+BSA 2,5%, e centrifugati a 1800 rpm a +4°C per 10'. Quindi, sono stati risospesi in 200 µL di PBS. Subito dopo è stata condotta l'analisi al citofluorimetro (FACScan, BD Biosciences). L'acquisizione e l'analisi dei dati sono state effettuate con il software Cell Quest Pro (BD Biosciences). Nei *Risultati*, le misure sono riportate come intensità di fluorescenza media dei campioni (*Mean Fluorescence Intensity*, MFI). L'MFI è il prodotto tra la percentuale di cellule positive e l'intensità di fluorescenza di queste ultime, e può essere considerato una misura della quantità di proteina localizzata sulla membrana per cellula esponente.

Analisi del ciclo cellulare

L'analisi del ciclo è stata condotta marcando le cellule con ioduro di propidio (PI). Almeno 1×10^5 cellule per campione sono state centrifugate e lavate in PBS. Il sedimento cellulare è stato risospeso con una soluzione contenente PI (40µg/ml in PBS; Sigma St. Louis, MO, USA) e RNase A (10 µg/ml; Sigma St. Louis, MO, USA), e incubato per 1 ora a 4 °C. Le cellule sono state poi analizzate per il contenuto di DNA tramite citofluorimetro (FACScan, BD Biosciences). Almeno 20.000 eventi/campione sono stati acquisiti e analizzati con il software Cell Quest Pro (BD Biosciences).

Colorazione May Grünwald-Giemsa

L'analisi morfologica delle linee NB4, HL-60 e U937, è stata condotta su preparati cellulari

colorati con il metodo May Grünwald-Giemsa. Per ogni campione, 20.000-40.000 cellule sono state centrifugate su un vetrino mediante citospin, a 400 rpm per 5 minuti. Successivamente il vetrino è stato immerso in May-Grünwald (Carlo Erba, Rodano, Milano) per 1' e 30". Il vetrino è stato poi immerso per 1 minuto in una soluzione di May-Grünwald e acqua bidistillata neutra 1:2; quindi è stato immerso in una soluzione di Giemsa (Carlo Erba, Rodano, Milano) diluita 1:20 in acqua bidistillata neutra per 15'. Il vetrino è stato lavato abbondantemente con acqua distillata e lasciato asciugare. Infine il preparato è stato osservato in immersione al microscopio ottico (Axioskop 20, Carl Zeiss, NY, USA), equipaggiato con una fotocamera digitale (AxioCam, Carl Zeiss).

Preparazione di RNA e cDNA

L'estrazione dell'RNA totale dalle cellule analizzate è stata effettuata con il metodo che impiega il reagente Trizol®, seguendo il protocollo fornito dalla ditta (Reagent, GibcoBRL).

Per la preparazione di cDNA, è stato usato 1 µg di RNA totale per campione, in una miscela di reazione contenente i seguenti componenti:

- RT-buffer 5X [Tris-SO₄ pH 9,1; (NH₄)₂SO₄ 90 mM];
- dNTP 10 mM, esameri casuali (sequenze casuali di nucleotidi in grado di appaiarsi a qualsiasi sequenza di RNA);
- 2,5 µM, ditiotreitolo (DTT) 0,1M;
- RNasi Out 2 u/µl;
- retrotrascrittasi del virus della leucemia murina (M-MLV, 10 u/µl, Roche Diagnostics).

La miscela di reazione è stata portata ad un volume finale di 30 µl con acqua RNasi free ed i campioni incubati per 1 h a 37°C.

L'espressione del let-c maturo è stata misurata tramite un metodo che prevede una

retrotrascrizione che fa uso di primers "stem-loop", seguita dall'analisi mediante Real-Time

PCR (*stem loop* RT-PCR; Chen et al, 2005). Per ogni campione, sono stati retro-trascritti 50 ng di RNA totale in una mix di reazione così composta:

- | | |
|----------------------------|---------|
| • dNTP mix (100 mM) | 0,15 µl |
| • Multiscribe™ RT (50U/µl) | 1,00 µl |

- 10 X RT Buffer 1,5 µl
- Rnase inhibitor (20 U/µl) 0,19 µl

alla quale sono stati aggiunti 3 µL di primer microRNA-specifico per hsa-let-7c, oppure per lo “small-non coding” RNA U19 (RNU19), usato come normalizzatore interno (0,25 mM; Applied Biosystems), e acqua RNasi-free fino al volume finale di 15 µL. La mix di reazione è stata incubata 5 minuti in ghiaccio, poi 30’ a 16°C, 30’ a 42°C, e 5’ a 85°C.

Real Time PCR

Le reazioni di Real-Time PCR (qRT-PCR), sono state effettuate utilizzando un termociclatore della ditta Applied Biosystem modello 7500 Real Time PCR System SDS v1.2.

L'espressione del let-7c e di CD14 è stata misurata mediante primers e sonda specifiche, sintetizzati dalla ditta Applied Biosystem in base a sequenze ricavate da ricerche svolte direttamente nei database disponibili in rete. Le reazioni di amplificazione per ciascun campione sono state effettuate in triplicato in un volume finale di 20 µl contenente: 1 µl del prodotto di retro-trascrizione specifico per il miRNA, oppure 1 µl di retro-trascritto “convenzionale” per CD14, TaqMan® Universal PCR Master Mix 1X (Applied Biosystem), 1 µl di una mix di sonda TaqMan® 200 nM, primer senso e primer antisenso 20x (Applied Biosystem). Il ciclo di amplificazione usato è quello standard, che prevede una prima fase di 2 minuti a 50°C, una seconda fase di 10 minuti a 95°C seguita da una successione di 40 cicli a 95°C per 15 secondi e 60°C per 1 minuto ognuno. I dati ottenuti sono stati analizzati con il metodo comparativo dei $\Delta\Delta C_t$. Per l'espressione di let-7c, la normalizzazione è stata fatta con sonde e primers specifici per lo “small-non coding” RNU19 (Applied Biosystem). Per l'espressione di CD14, la normalizzazione è stata fatta con sonde e primers specifici per β -actina (Applied Biosystem).

L'espressione di PBX2 è stata misurata con il metodo Sybr Green®; le reazioni di amplificazione, per ciascun campione, sono state effettuate in triplicato in un volume finale di 20 µl contenente: 10 µl di Sybr Green® Master Mix 2x, primers specifici 300 nM (FW - CTGCAGCAGATAATGACCATCAC; RV - GCAGTTTAGGGCGTGTTCCTTG) e acqua fino al volume di 20 µl. Il ciclo di amplificazione usato è quello standard, incluso lo stadio finale di dissociazione. I dati ottenuti sono stati analizzati con il metodo comparativo dei $\Delta\Delta C_t$. La normalizzazione è stata fatta con primers specifici per il gene GAPDH (FW -

TCCCTGAGCTGAACGGGAAG; RV - GGAGGAGTGGGTGTCGCTGT).

Predizione bioinformatica dei bersagli di let-7c

I bersagli molecolari del let-7c sono stati identificati utilizzando quattro programmi di predizione accessibili pubblicamente in rete. I software sono stati utilizzati singolarmente per ricorrere alla versione più aggiornata dell'algoritmo o per modificare i parametri di predizione.

TargetScan vers 5.2 <http://genes.mit.edu/targetscan> (Lewis et al, 2003)

Esegue l'analisi dei microRNA conservati nelle specie e i gruppi delle sequenze del 3'UTR ortologhe. I criteri che stanno alla base di questo strumento bioinformatico sono:

- uso di 7 nucleotidi presenti nei miRNA, identificati come “seed” per individuare i motivi complementari alla regioni del 3'UTR;
- conservazione evolutiva dei siti;
- estensione della “seed”, per individuare la migliore energia termodinamica;
- analisi comparative di calcolo del legame, con sequenze “mescolate” che mimano il miRNA reale.

PicTar ([http:// pictar.mdc-berlin.de](http://pictar.mdc-berlin.de)) strumento bioinformatico ideato dal gruppo di Krek e collaboratori, che fornisce una lista dei miRNA che sono conservati nelle specie impostando le sequenze del 3' UTR ortologhe (Krek et al, 2005). I criteri alla base sono:

- uso della “seed” di ogni miRNA per identificare le regioni di complementarietà perfetta ed imperfetta con i 3'UTR;
- predizione dell'energia libera ottimale dell'ibrido microRNA-mRNA;
- analisi della conservazione dei siti di legame;
- assegnazione di uno “score” elevato nel caso in cui si individuino siti multipli di legame del miRNA.

MiRanda vers 3.0 ([http:// www.microrna.org/](http://www.microrna.org/)) è lo strumento per la predizione di bersagli dei miRNA sviluppato al Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (New York). La prima versione (2003) è stata utilizzata per determinare i bersagli di miRNA in *Drosophila melanogaster*

(Enright et al, 2003). I criteri su cui si basa l'algoritmo di miRanda sono:

- appaiamento delle sequenze microRNA-mRNA;
- valutazione termodinamica dei duplex predetti;
- analisi della conservazione dei siti di legame.

MirTarget vers 2.0 (<http://mirdb.org/>) è uno strumento di predizione dei bersagli molecolari dei miRNA sia conservati che non. Si basa sulla struttura delle macchine a vettori di supporto (SVM, dall'inglese *Support Vector Machines*), ovvero un insieme di metodi di apprendimento automatici, contrapposto alle tecniche classiche di "training" delle reti neurali (Wang, 2008).

Western Blot

Estratti proteici totali sono stati ottenuti mediante lisi con buffer RIPA [150 mmol/L NaCl; 50 mmol/L Tris HCl, 0.1 mmol/L EDTA, 0.1 mmol/L EGTA, 0.1% Sodio Dodecilsolfato (SDS), 0.1% deossicolato, 1% Igepal.], con aggiunta inibitori di proteasi [10 µg/mL Leupeptina, 10 µg/mL Aprotinina, 1mM Sodio Ortovanadato e 1 mM Fenilmetilsulfonilsolfato (PMSF)]. Il dosaggio delle proteine è stato effettuato con il metodo Bradford, usando il colorante "*Coomassie Brilliant Blue G-250*" (Biorad). La concentrazione delle proteine è stata calcolata sull'assorbanza a 595 nm del campione allo spettrofotometro (DU®730, Beckman Coulter).

30 µg di estratto proteico sono stati caricati su gel di poliacrilammide. Dopo SDS-PAGE, le proteine sono state trasferite su filtri di nitrocellulosa. Il blocking è stato fatto per 1h a RT in 5% latte PBS-tween 0,05%. Per Pbx2, c'è stato utilizzato over-night un anticorpo (G-20, sc-890, Santa Cruz Biotechnology) 1:1000 in 3% latte PBS-tween (PBS-t) 0,05%. Per Pbx3, c'è stato utilizzato over-night un anticorpo (D-17, sc-891, Santa Cruz Biotechnology) 1:100 in 5% latte TBS-tween (PBS-t) 0,05%. L'anticorpo anti-pan-Ras (OP40, Ab-3, Calbiochem) è stato usato over-night 1:1000 in 2% latte TBS-tween (TBS-t) 0,05%. Un anticorpo anti-actina (CP01, Ab-1, Calbiochem) è stato usato per 1h a RT 1:15.000 in 5% latte TBS-t.

Dopo 3 lavaggi in TBS-t, i filtri sono stati incubati con un anticorpo secondario coniugato

all'enzima HRP (Perossidasi di Rafano): Ultra-Tek anti-mouse (ScyTek laboratories inc.) per actina e pan-Ras; anti-rabbit (Bio-Rad, Hercules CA, USA) per Pbx2 e Pbx3, per 1 h a RT. I livelli di espressione della proteina sono stati rilevati tramite utilizzo del kit Western Blot Luminol Reagent (Santa Cruz Biotechnologies) e successiva esposizione a lastra autoradiografica. Le analisi di densitometria sono state realizzate usando il software ImageJ (NIH).

Costrutti luc e saggi luciferasici

Il frammento di 3'UTR umano di Pbx2 (NM_002586), contenente i siti di legame per il let-7c, è stato amplificato per PCR da DNA genomico e clonato nel vettore pGL3 Control (Promega) a valle del gene della luciferasi. Sono stati usati i seguenti primers:

FW: 5'-TCTGGAATCTGTGGAGACGCCAGCCCTG-3'

RV: 5' GTTCAACCCCAAAGCCCAGTCAATAATTCCC-3'.

I mutanti per delezione sono stati ottenuti mediante digestione con enzimi di restrizione. Per i saggi di attività luciferasica, la linea recettore 293T è stata trasfettata transientemente con Lipofectamine® 2000 (Invitrogen) in dish da 60 mm, usando 50 ng di *Renilla* luciferasi pRL-TK e 0,8 µg di plasmide reporter luciferasi contenente PBX2 3'UTR *wild-type* o i costrutti deleti ($\Delta 543-549$; $\Delta 611-617$; $\Delta 543-617$), e 40 pmol di mimic-let-7c o di mimic Negative Control. Il vettore pRL-TK, che fornisce un'espressione costitutiva della luciferasi *Renilla*, è stato co-trasfettato come controllo interno per correggere le differenze sia nell'efficienza di trasfezione che di raccolta delle cellule. L'attività luciferasica è stata misurata dopo 48 ore dalla trasfezione e normalizzata con l'attività della *Renilla*, usando il kit Dual Luciferase assay (Promega). L'attività luciferasica normalizzata del controllo (pGL3 control) è stata posta uguale a 1. Per ogni esperimento, i punti sono stati fatti in duplicato.

Analisi statistica

Per ogni esperimento, i risultati sono espressi come media aritmetica di 3 esperimenti indipendenti, \pm l'errore standard della media (*Standard Error of the Mean*, S.E.M.). Le analisi statistiche sono state condotte usando il test t di Student, e l'ipotesi nulla è stata respinta dal livello di 0,05.

Risultati

L'iper-espressione del let-7c induce differenziamento in cellule di leucemia mieloide acuta

Per studiare il potenziale ruolo biologico del let-7c in cellule di LAM, sono stati valutati gli effetti della sua iperespressione nelle linee cellulari leucemiche NB4 (FAB M3), HL-60 (FAB M2) e nella linea monocitaria di linfoma istiocitico U937 (pseudo FAB-M5). Le cellule sono state elettroporate con un RNA a doppio filamento sintetico di sequenza identica al let-7c maturo (mimic let-7c), che “mima” il microRNA endogeno prima dell'ingresso nel complesso RISC. Come controllo negativo, le cellule sono state elettroporate con un mimic che ha una sequenza con identità minima verso i microRNA umani (mimic Negative Control). L'efficienza di trasfezione varia per tutte le linee tra il 40% e il 65%, come misurato in base alla percentuale di cellule GFP-positive a 24 ore dall'elettroporazione con il vettore plasmidico *pmaxGFP* (vedi *Materiali e Metodi*). Per confermare l'avvenuta iper-espressione del microRNA, abbiamo misurato i livelli di let-7c nelle cellule elettroporate dopo 24 ore dalla trasfezione (**Figura 4a**).

A 24 ore dalla trasfezione, le cellule sono state trattate con ATRA ed è stato valutato l'effetto dell'espressione ectopica del let-7c sul differenziamento mieloide. L'analisi citofluorimetrica ha rivelato che i livelli di espressione dell'integrina α CD11b, un tipico marcatore di membrana del differenziamento granulo-monocitario (vedi *Capitolo 1.2 La mielopoiesi*), sono aumentati, in tutte le linee analizzate, nelle cellule iper-esprimenti let-7c rispetto al controllo, indicando che il let-7c stimola il differenziamento indotto da ATRA (**Figura 4b**). Inoltre, abbiamo osservato che, in cellule non trattate con ATRA e analizzate agli stessi tempi, l'iper-espressione del let-7c è capace di indurre un aumento variabile di CD11b in tutte le linee studiate, suggerendo che la sola espressione ectopica del miR sia sufficiente ad indurre differenziamento mieloide (**Figura 4b**).

Lo studio dell'effetto sul differenziamento indotto dall'espressione esogena di let-7c è stato ulteriormente valutato mediante un'analisi morfologica delle linee in esame, sia in cellule non trattate che dopo trattamento con ATRA. Tutte le cellule iper-esprimenti let-7c mostrano lievi modificazioni morfologiche rispetto al controllo, quali: una riduzione del volume cellulare, un aumentato rapporto citoplasma-nucleo, un principio di indentatura del nucleo e di condensazione della cromatina. Questi cambiamenti, seppure lievi, confermano una

progressione delle cellule verso uno stato più differenziato (**Figura 5**; vedi anche *Capitolo 1.2 La mielopoiesi*).

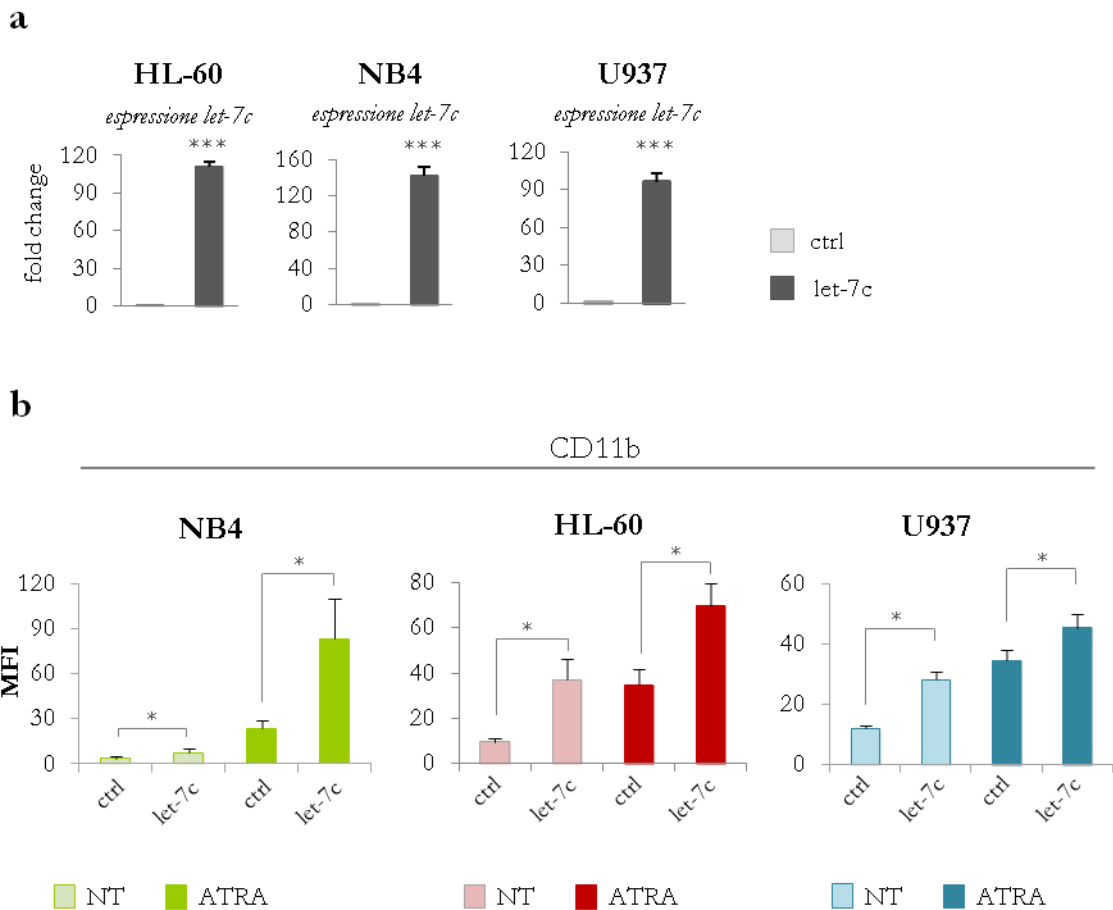


Figura 4. L'iper-espressione del let-7c induce differenziamento mieloido in linee cellulari di LAM – Analisi immunofenotipica a) Livello di espressione del let-7c nelle linee indicate a 24 ore dall'elettroporazione con mimic-let-7c (*let-7c*) o mimic-Negative Control (*ctrl*), misurata tramite *stem-loop* qRT-PCR. I campioni sono stati normalizzati per RNU19. I valori sono riportati con *fold change* rispetto al controllo. Le barre di errore indicano la S.E.M. (n=3) *** p value <0.001 (t-student test); b) Espressione di CD11b nelle linee indicate, misurata tramite analisi al FACS, in cellule elettroporate con mimic-let-7c (*let-7c*) o con mimic-Negative Control (*ctrl*). A 24 ore dall'elettroporazione, una parte delle cellule è stata trattata con ATRA 1 μ M per 48 ore; quindi, cellule trattate e non trattate sono state analizzate al citfluorimetro (FACS). I valori sono espressi come *Mean Fluorescence Intensity* (MFI). Le barre di errore indicano la S.E.M. (n=3) * p value <0.05 (t-student test).

L'effetto dell'iper-espressione del let-7c sul differenziamento è stato anche valutato in blasti leucemici primari di pazienti di LAM di nuova diagnosi. Le caratteristiche morfologiche e genetiche dei blasti analizzati sono mostrate in **Figura 6a**. I blasti leucemici sono stati infettati

con un lentivirus codificante per il let-7c e, come controllo, con un vettore lentivirale vuoto (*mock*). Dopo 48 ore, è stata confermata l'avvenuta induzione del let-7c (**Figura 6b**), ed i blasti infettati sono stati analizzati per l'espressione di CD11b. L'espressione ectopica del let-7c nei blasti induce un'aumentata espressione di CD11b rispetto al controllo (**Figura 6c**), confermando che l'iper-espressione del let-7c sia in grado di indurre differenziamento granulo-monocitario in cellule di LAM.

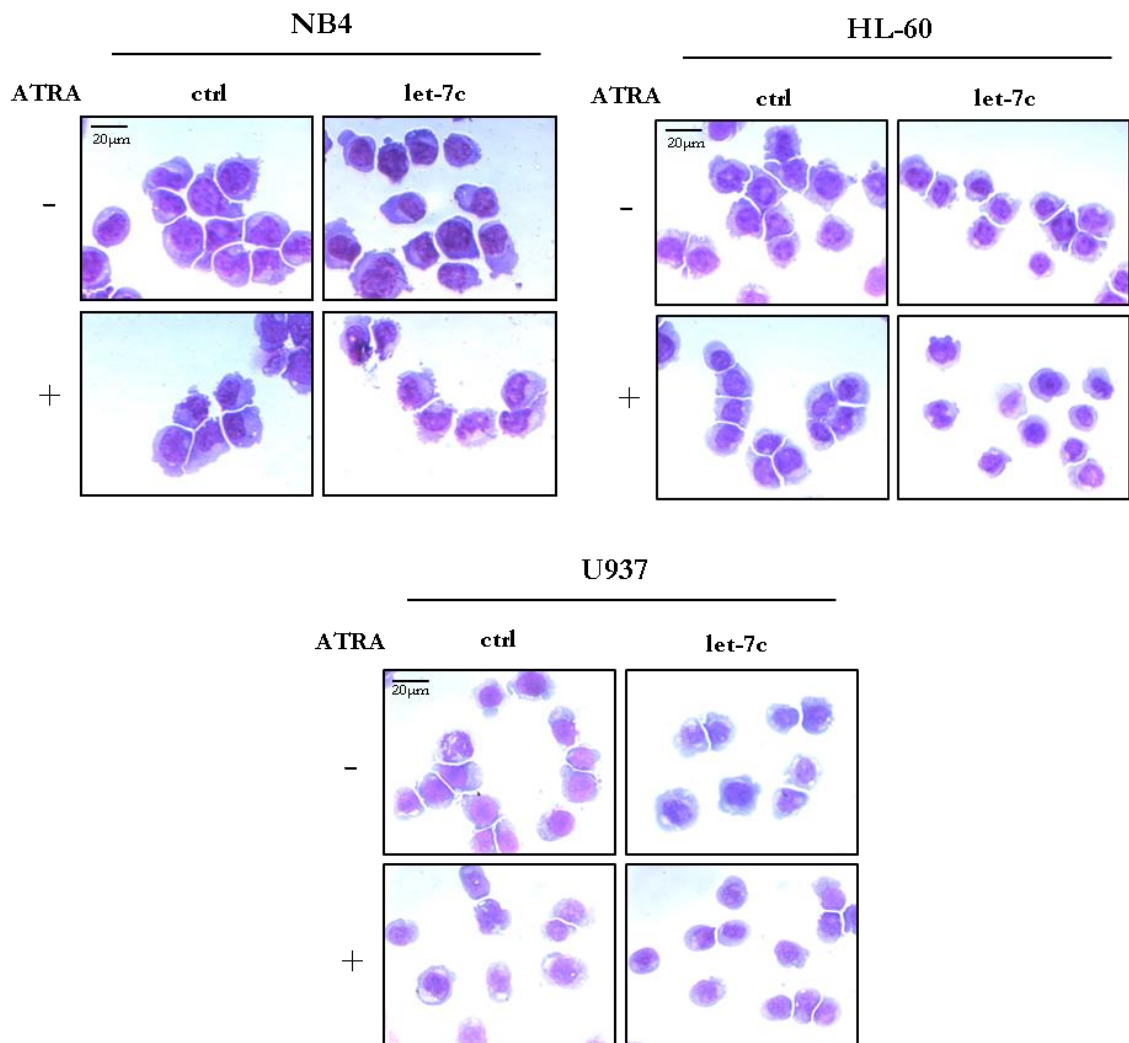


Figura 5. L'iper-espressione del let-7c induce differenziamento mieloide in linee cellulari di LAM - Analisi morfologica. Citospin colorati con May-Grünwald-Giemsa delle linee cellulari indicate, elettroporate con mimic let-7c (*let-7c*) o mimic Negative Control (*ctrl*). A 24 ore dall'elettroporazione, una parte delle cellule è stata trattata con ATRA 1 μM per 48 ore; quindi, cellule trattate e non trattate sono state analizzate per morfologia. Per ogni linea cellulare, è mostrato un esperimento rappresentativo di 3. Ingrandimento originale 630x.

a

<i>Paziente</i>	<i>FAB</i>	<i>Cariotipo</i>	<i>Genetica</i>
LAM #1	M2	normale	NPM1+
LAM #2	M5	normale	NPM1+

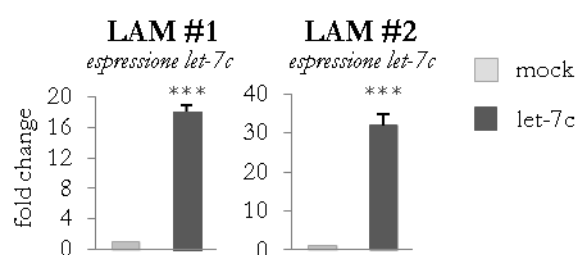
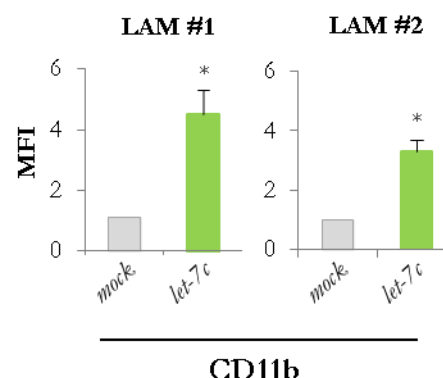
b**c**

Figura 6. L'iper-espressione del let-7c induce differenziamento mieloido in blasti primari di LAM. a) Caratteristiche morfologiche e genetiche dei 2 pazienti LAM analizzati; b) Livello di espressione del let-7c nei blasti leucemici a 48 ore dall'infezione con un lentivirus esprimente il let-7c (*let-7c*) o con un lentivirus di controllo (*mock*), misurata tramite *stem-loop* qRT-PCR. I campioni sono stati normalizzati per RNU19. I valori sono riportati con *fold change* rispetto al campione *mock*. Le barre di errore indicano la S.E.M. (n=3) *** p value <0.001 (t-student test); c) Espressione di CD11b nei blasti LAM misurata al FACS dopo 48 ore dall'infezione con il lentivirus esprimente let-7c (*let-7c*) e con il lentivirus di controllo (*mock*). I valori sono espressi come MFI, e normalizzati rispetto al mock. Le barre di errore indicano la S.E.M. (n=3) * p value <0.05 (t-student test).

L'iper-espressione del let-7c induce differenziamento in cellule di LAM specificamente lungo la linea granulocitaria

In appropriate condizioni di coltura, le cellule di LAM, per la loro natura bipotente granulomonocitaria, possono essere indotte a differenziare lungo la linea granulocitaria o monocitaria, (Brown et al, 2002; Bhatia et al, 1996). Per approfondire lo studio sul differenziamento delle cellule LAM mediato dal let-7c, abbiamo investigato la potenziale linea-specificità di questo processo. A questo scopo, le linee NB4 e HL-60 sono state indotte a differenziare verso la linea granulocitaria mediante trattamento con ATRA, o verso la linea monocitaria mediante trattamento con 12-O-tetradecanoilforbolo-13-acetato (TPA) per le HL-60, o con una

combinazione di 1,25-diidrossi-vitamina D3 (VD3) e TPA per le NB4 (Bhatia et al, 1996). Come mostrato in **Figura 7a**, l'espressione del let-7c aumenta nelle cellule NB4 e HL-60 indotte con ATRA a differenziare lungo la linea granulocitaria. Al contrario, l'induzione del differenziamento lungo la linea monocitaria è accompagnato da una diminuita espressione di let-7c nelle HL-60, e da nessuna modulazione significativa nelle NB4 (**Figura 7a**). In accordo con questi dati, l'espressione ectopica di let-7c non determina nessuna modulazione significativa del CD14, un antigene di membrana specificamente associato al differenziamento monocitario (Vedi anche *Capitolo 1.2 La mielopoiesi*; **Figura 7b** e **Figura 7c**). Presi assieme, questi dati suggeriscono fortemente che l'effetto pro-differenziante del let-7c in cellule di LAM sia specifico per la maturazione verso la linea granulocitaria.

L'iper-espressione del let-7c in cellule di LAM non altera la proliferazione

Numerosi studi hanno mostrato che i membri della famiglia let-7 possono giocare un ruolo importante nel controllo del ciclo cellulare sia in tessuti normali che tumorali, e alcuni bersagli molecolari noti di questa famiglia sono fattori che regolano la proliferazione cellulare (vedi *Capitolo 3 – MicroRNA e leucemie* e Büssing et al, 2008). Per studiare il possibile ruolo del let-7c sulla proliferazione cellulare nella LAM, abbiamo iper-espresso il let-7c in linee cellulari mieloidi (NB4, HL-60 e U-937) e valutato gli effetti sul ciclo cellulare in cellule non trattate e trattate con ATRA. Mediante analisi di FACS mostriamo che l'iper-espressione del let-7c non determina, nelle linee analizzate, perturbazioni significative delle diverse fasi del ciclo (**Figura 8a**).

Per valutare, i possibili effetti dell'iper-espressione del miRNA sulla proliferazione cellule di leucemia promielocitica, NB4 sono state infettate con un lentivirus codificante il let-7c (**Figura 8b**). La proliferazione cellulare, valutata mediante conte vitali, non mostra nessuna modificazione, sia in cellule trattate con ATRA che in assenza di trattamenti, rispetto ai controlli (**Figura 8c**). Inoltre, non abbiamo osservato modificazioni di vitalità cellulare, che rimane alta per tutti i punti nella finestra di tempo studiata (dati non mostrati). A supporto di ciò, l'analisi al FACS rivela che la percentuale di cellule in sub-G₁ delle NB4, HL-60 e U-937 iper-esprimenti il let-7c, non è significativamente alterata rispetto ai relativi controlli (**Figura 8a**).

Complessivamente, questi dati indicano che l'iper-espressione del let-7 non altera significativamente la proliferazione e la vitalità cellulare nelle linee di LAM analizzate.

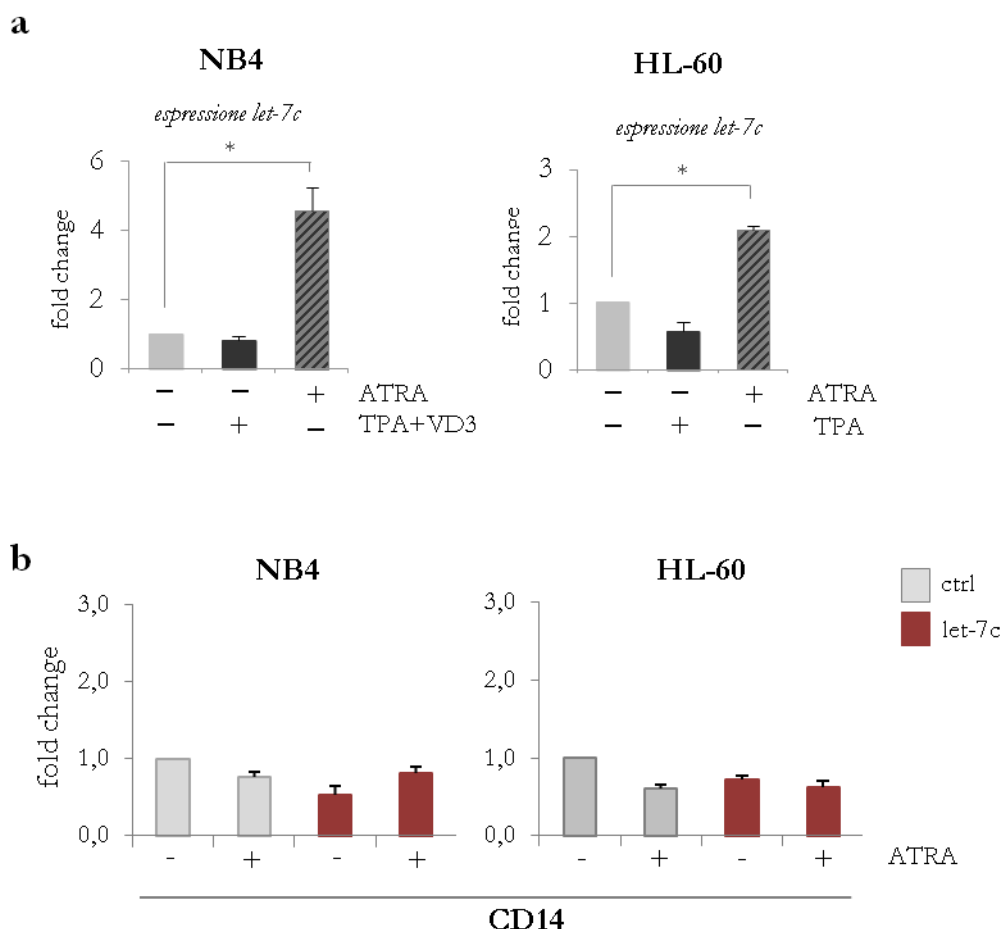


Figura 7. Il let-7c induce differenziamento specificamente lungo la linea granulocitaria. a) Espressione del let-7c nelle linee LAM indicate, misurata come indicato nella legenda della Figura 1. Le cellule sono state trattate con ATRA (48 ore), con TPA 50 nM (48 ore) per le HL-60, o con una combinazione di TPA 50 nM e Vitamina D3 200 nM (VD3; 72 ore) per le NB4. I valori sono riportati come fold change rispetto alle cellule non trattate. Le barre indicano la S.E.M. (n=3) * p value <0.05 (t-student test).

b) Livello di espressione dell'antigene di membrana monocitario CD14 in NB4 e HL-60 non trattate e trattate con ATRA (72 ore), elettroporate con mimic-let-7c (*let-7c*) e mimic-Negative Control (*ctrl*). L'espressione di CD14 è stata misurata tramite qRT-PCR, e i valori normalizzati sull'espressione dell'mRNA di β -actina. I valori sono riportati come *fold change* rispetto allo scramble. Le barre di errore indicano la S.E.M. (n=3).

Analisi del ruolo di let-7c nella granulopoiesi normale

L'effetto pro-differenziante del let-7c osservato in cellule leucemiche ci ha indotto a studiare il possibile coinvolgimento di questo miRNA anche nella granulopoiesi normale. In primo luogo, abbiamo misurato l'espressione del let-7c durante il normale differenziamento granulocitario. A questo scopo, cellule staminali pluripotenti CD34+ umane, prelevate da cordone ombelicale, sono state indotte a differenziare *in vitro* verso la linea granulocitaria con

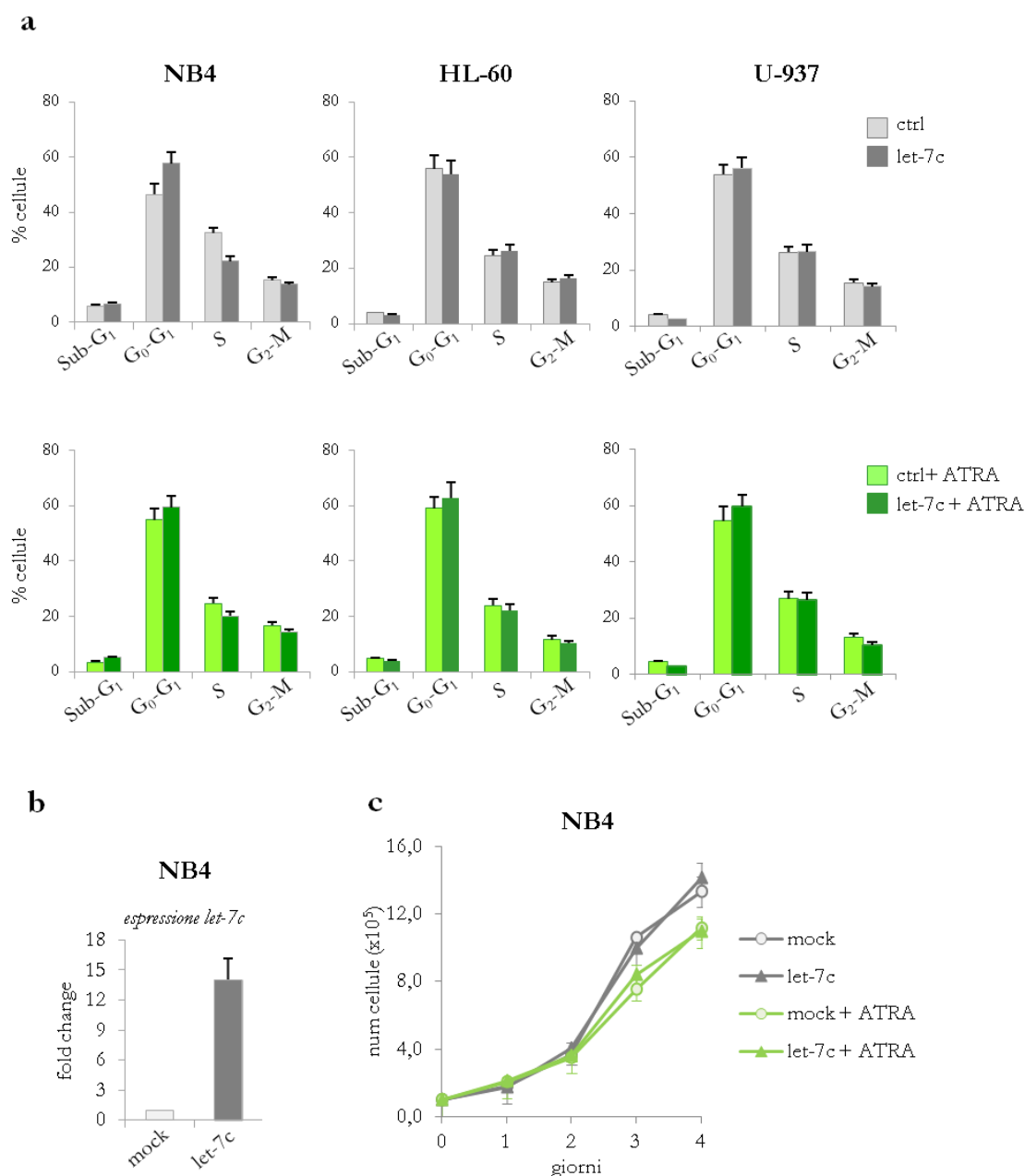


Figura 8. L'iper-espressione dei let-7c non altera la proliferazione in cellule di LAM.

Analisi del ciclo cellulare nelle linee leucemiche indicate, non trattate (pannello superiore) e trattate con ATRA per 48 ore (pannello inferiore). Le cellule sono state elettroporate con mimic-let-7c (*let-7c*) o con mimic-Negative Control (*ctrl*), come descritto nella legenda della Figura 1. Le barre di errore indicano la S.E.M. (n=3). **b)** Livello di espressione del let-7c misurata tramite *stem-loop* qRT-PCR in NB4 a 4 giorni dall'infezione con un lentivirus per let-7c (*let-7c*) o con un lentivirus di controllo (*mock*). I campioni sono stati normalizzati per RNU19. I valori sono riportati con *fold change* rispetto allo scramble. Le barre di errore indicano la S.E.M. (n=3); **c)** Curve di proliferazione di NB4 non trattate e trattate con ATRA (4 giorni) e infettate con lentivirus per let-7c (*let-7c*) o con un lentivirus di controllo (*mock*). Le barre di errore indicano la S.E.M. (n=3).

un cocktail di citochine (vedi *Materiali e Metodi*). Questo sistema di coltura *ex vivo* consente l'analisi di precursori "puri" specifici della serie granulocitaria lungo i vari stadi della maturazione, partendo da cellule staminali indifferenziate CD34+ al giorno 0, fino a granulociti terminalmente differenziati, dopo un periodo di due settimane circa (Testa et al, 1996). Sono stati poi presi campioni a vari giorni (giorno 0, 7 e 14) durante il differenziamento indotto, corrispondenti a stadi maturativi diversi del leucocita (vedi **Figura 9a**), e saggiati per l'espressione di let-7c mediante qRT-PCR. Come mostrato in **Figura 9b**, l'espressione del let-7c è modulata durante la granulopoiesi: aumenta nei promielociti (giorno 7) rispetto ai precursori CD34+ (giorno 0), e scende poi nei granulociti terminalmente differenziati (giorno 14).

Successivamente, abbiamo interferito l'espressione del let-7c in questo sistema, per investigare sul possibile ruolo funzionale di questo miRNA nel normale differenziamento granulocitario. A questo scopo, abbiamo trasfettato i precursori CD34+ con un antago-miR diretto contro il let-7c endogeno (**Figura 9c**) e valutato l'impatto del suo silenziamento sul differenziamento granulocitario misurando i livelli di CD11b durante la cinetica granulocitaria (giorni 7, 9 e 12). Le cellule "knock-down" per let-7c non mostrano cambiamenti evidenti nell'espressione di CD11b rispetto al controllo, suggerendo che l'inibizione dell'espressione di let-7c non influenzi la granulopoiesi normale.

Analisi *in silico* dei putativi bersagli molecolari del let-7c

Per identificare i putativi bersagli molecolari coinvolti nel differenziamento indotto da let-7c in cellule leucemiche, è stata effettuata un'analisi *in silico* mediante strumenti bio-informatici disponibili sul web. In particolare, per questa analisi sono stati utilizzati gli algoritmi: miRanda (<http://www.microrna.org/microrna>), TargetScan 5.2 (<http://www.targetscan.org>), Pictar (<http://www.pictar.org>) e miRDB (<http://mirdb.org/miRDB/>). L'uso di questi specifici algoritmi di ricerca, mirati all'identificazione di mRNA bersaglio sulla base della complementarità di sequenza e conservazione evolutiva del 3' UTR con la "seed" del miRNA scelto (vedi *Materiali e Metodi*), ha prodotto una pletora di potenziali bersagli per il let-7c, in parte non sovrapponibili a causa dei diversi criteri di analisi impiegati dai vari algoritmi.

Per circoscrivere la nostra analisi, abbiamo quindi deciso di considerare inizialmente solo quei putativi bersagli con funzioni note nell'ambito dell'ematopoiesi normale e/o trasformata, nel controllo della proliferazione e/o del ciclo cellulare. In **Figura 10**, sono riportati alcuni

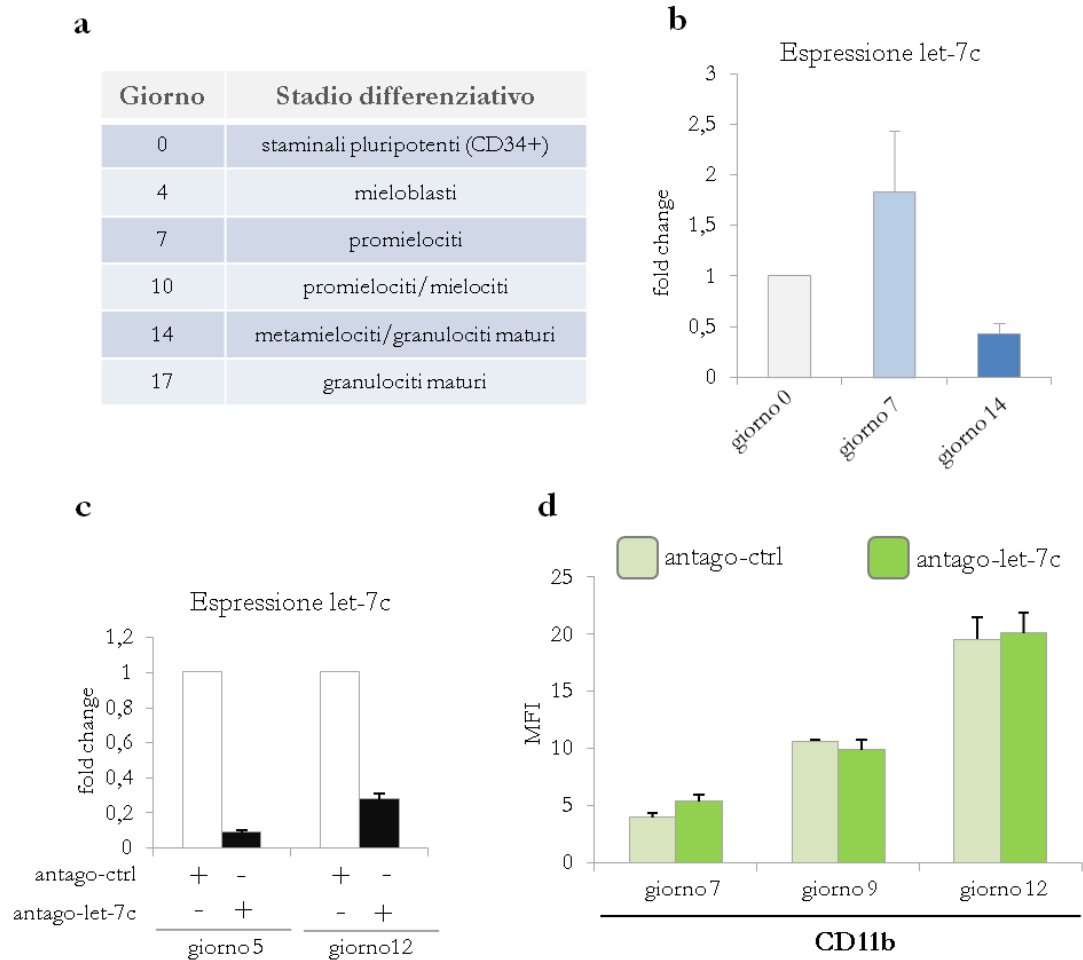


Figura 9. Ruolo del let-7c nella granulopoiesi normale. **a)** Tabella riassuntiva degli stadi differenziativi corrispondenti ai vari giorni del sistema di maturazione granulocitaria *in vitro*; **b)** Espressione del let-7c misurata tramite *stem-loop* qRT-PCR durante la cinetica granulocitaria, da campioni prelevati ai giorni 0 (CD34+), 7 (promielociti) e 14 (granulociti). I valori sono in *fold change* rispetto al campione al giorno 0. I campioni sono stati normalizzati per RNU19. Le barre indicano la S.E.M. (n=3); **c)** Espressione del let-7c misurata tramite *stem-loop* qRT-PCR da cellule al giorno 5 e 12 della cinetica granulocitaria, trasfettate al giorno 2 con un antago-miR diretto contro il let-7c (*antago-let-7c*) o un antago-miR di controllo (*antago-ctrl*). I campioni sono stati normalizzati per RNU19. Valori in *fold change* rispetto al controllo. Le barre di errore indicano la S.E.M. (n=3); **d)** Espressione di CD11b misurata al FACS al giorno 7, 9 e 12 di cinetica granulocitaria, in cellule trasfettate con antago-let-7c e antago-ctrl. I valori sono espressi come MFI. Le barre di errore indicano la S.E.M. (n=3).

bersagli molecolari selezionati sulla base di questo criterio, grossolanamente raggruppati in base alla loro funzione molecolare ed al processo biologico nel quale sono coinvolti. Per restringere ulteriormente l'analisi, abbiamo deciso di concentrare la nostra attenzione sui bersagli che risultavano confermati dall'analisi incrociata di almeno tre algoritmi. In

particolare, abbiamo focalizzato lo studio su due proteine con un possibile ruolo biologico nelle AML: PBX2 e PBX3, due membri della super-famiglia TALE con un ruolo descritto nelle leucemie (Schnabel et al, 2000; Wong et al, 2007; vedi anche *Capitolo 2.5 La famiglia di proteine Pbx e leucemie*).

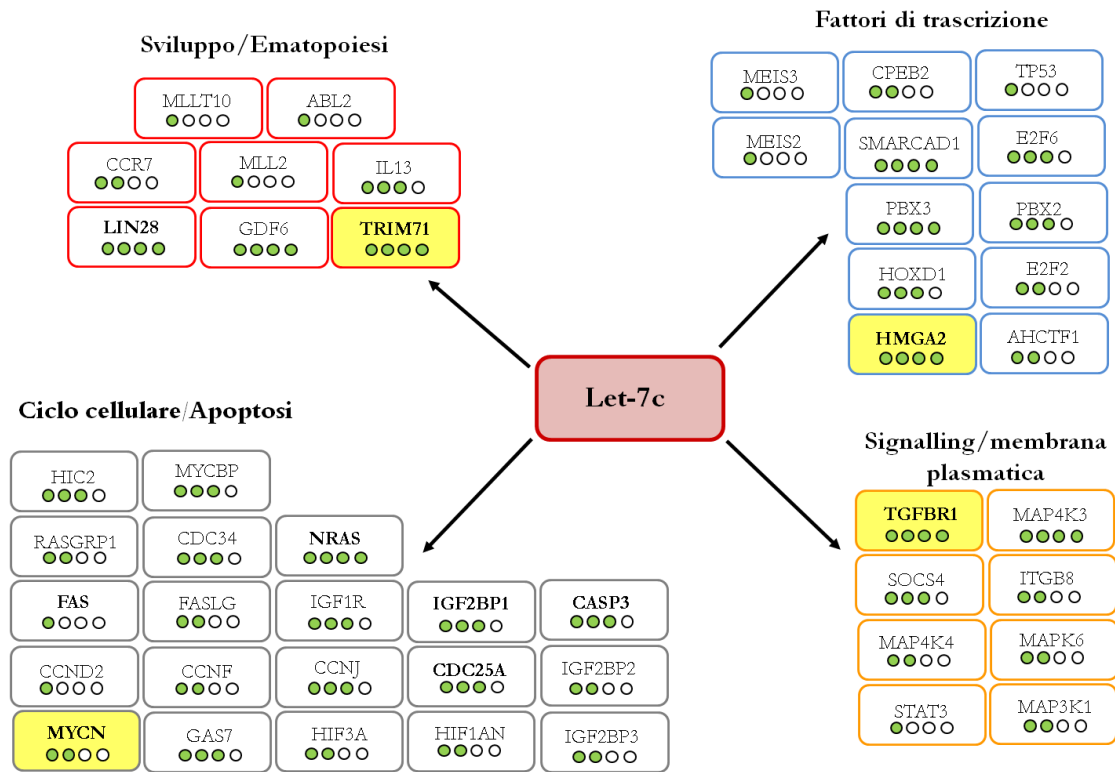


Figura 10. Bersagli putativi di let-7c. Schema rappresentativo di una selezione dei bersagli putativi del let-7c, identificati tramite gli algoritmi MiRanda, PicTar, TargetScan 5.2 e miRDB (vedi *Materiali e Metodi*). I pallini pieni rappresentano il numero di algoritmi capaci di predire il gene come un bersaglio del let-7c. In grassetto, i bersagli già validati sperimentalmente per membri della famiglia let-7. Evidenziati in giallo, i bersagli validati specificamente per il let-7c.

L'espressione delle proteina PBX2 è ridotta in cellule di LAM iper-esprimenti let-7c

Per verificare se PBX2 e PBX3 siano bersagli della regolazione di let-7c, abbiamo innanzitutto misurato i livelli endogeni di queste proteine in NB4 trasfettate con mimic-let-7c, rispetto a cellule trasfettate con un mimic di controllo. Abbiamo anche misurato l'espressione di RAS in questo sistema, essendo un bersaglio noto e ben descritto in letteratura della famiglia let-7 (Johnson et al, 2005; Büsing et al, 2008). Come mostrato in **Figura 11a**, l'espressione ectopica

del let-7c determina una riduzione della proteina di PBX2, ma non di PBX3. Questi dati sono stati confermati anche in HL-60 e U-937 (**Figura 11b**).

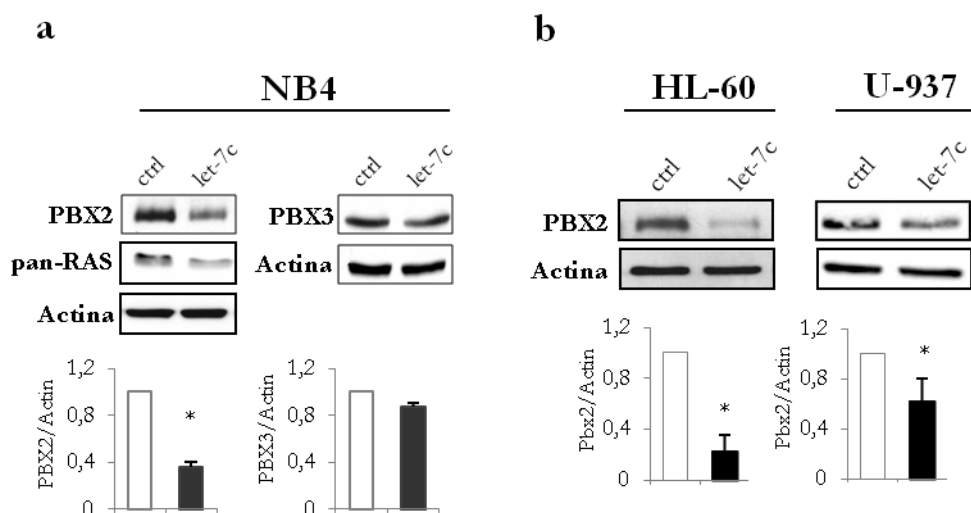


Figura 11. L'espressione di Pbx2 è ridotta in cellule di LAM iper-esprimenti let-7c. **a)** (pannello superiore) Western Blot rappresentante l'espressione endogena delle proteine Pbx2 e Pbx3 in NB4 a 72 ore dall'elettroporazione con mimic-let-7c (*let-7c*) e mimic-Negative Control (*ctrl*). Un anticorpo diretto contro tutte le isoforme di RAS (pan-RAS) è stato usato come controllo del sistema, essendo un bersaglio noto della famiglia let-7. E' mostrato un esperimento rappresentativo di tre; (pannello inferiore) Analisi densitometrica dei Western Blot per Pbx2 e Pbx3, realizzata con il software ImageJ (NIH). I numeri rappresentano la densità media (in unità arbitrarie) misurata dal software, normalizzata per l'espressione di β -actina. I valori di espressione di Pbx2 (barre nere) sono espressi come *fold change* rispetto allo scramble (barre bianche). Le barre di errore indicano la S.E.M. (n=3) * p value <0.05 (t-student test). **b)** (pannello superiore) Western Blot di Pbx2 endogeno in HL-60 e U-937, dopo 72 ore dall'elettroporazione con mimic-let-7c (*let-7c*) e mimic-Negative Control (*ctrl*). E' mostrato un esperimento rappresentativo di tre; (pannello inferiore) Analisi densitometrica di Western Blot per l'espressione di Pbx2 e Pbx3, realizzata con il software ImageJ (NIH), come descritto sopra. Le barre di errore indicano la S.E.M. (n=3) * p value <0.05 (t-student test).

Espressione di PBX2 nel differenziamento indotto da ATRA

I dati ottenuti suggeriscono che Pbx2 sia un possibile bersaglio del let-7c, potenzialmente implicato nella patogenesi delle leucemie. Abbiamo quindi valutato i livelli d'espressione di PBX2 in NB4 e U-937 dopo trattamento con ATRA. L'espressione della proteina Pbx2 è solo leggermente influenzata dall'ATRA in entrambe le linee studiate, e i suoi livelli si mantengono pressoché costanti fino a 96 ore di trattamento (**Figura 12a**, pannello superiore). Tuttavia,

nonostante i livelli della proteina Pbx2 rimangano costanti, si ha invece un aumento dell'mRNA di PBX2 dopo trattamento con ATRA, sia in NB4 che in U-937 (**Figura 12a**, pannello inferiore). E' interessante osservare che quando i livelli della proteina di Pbx2 vengono normalizzati con quelli dell'mRNA, il rapporto proteina/mRNA risulta fortemente diminuito in seguito a trattamento con ATRA, come illustrato in **Figura 12b**. La discrepanza osservata nei livelli di espressione di proteina e mRNA di PBX2 suggerisce che meccanismi regolatori post-trascrizionali (vedi *Discussione*), possano essere implicati nella regolazione dell'espressione di PBX2 a seguito del trattamento con ATRA. Questi meccanismi sono tipicamente associati alla regolazione dei miRNA. In accordo con questi dati, l'espressione del let-7c aumenta nelle NB4 ed U937 dopo trattamento con ATRA (**Figura 12c**). Questi dati suggeriscono che la regolazione negativa post-trascrizionale di Pbx2 possa essere mediata, almeno in parte, dal miRNA let-7c.

Inoltre, come mostrato in **Figura 12d**, abbiamo osservato una correlazione inversa tra l'espressione di PBX2 e let-7c in blasti derivanti da pazienti di LAM di nuova diagnosi, suggerendo che PBX2 possa rappresentare un bersaglio molecolare del let-7c *in vivo* in cellule di LAM.

Pbx2 è un bersaglio molecolare diretto del let-7c

L'analisi *in silico* realizzata con gli strumenti di predizione bio-informatici (vedi *Materiali e Metodi*), ha rivelato la presenza di 2 siti di legame conservati per il let-7c, come illustrato in **Figura 13a**. Per validare sperimentalmente PBX2 come bersaglio diretto del miRNA let-7c, un frammento del 3'UTR umano di PBX2 contenente le sequenze di legame *wild type* del let-7c, oppure mutanti per delezione dei siti let-7c ($\Delta 543-549$; $\Delta 611-617$; $\Delta 543-617$), sono stati clonati a valle di un gene reporter della luciferasi (**Figura 13b**). I saggi di luciferasi, condotti sulla linea cellulare embrionale 293T, hanno evidenziato che l'attività luciferasica relativa del reporter è soppressa quando viene co-trasfettato il mimic-let-7c. In contrasto, questa riduzione è minore nelle co-trasfezioni con i mutanti $\Delta 543-549$ e $\Delta 611-617$, ed è completamente abrogata nel mutante che manca di entrambi i siti di legame per il let-7c (**Figura 13b**). Questi risultati indicano che il let-7c può sopprimere l'espressione di Pbx2 interagendo direttamente con i siti di legame presenti sul suo 3'UTR .

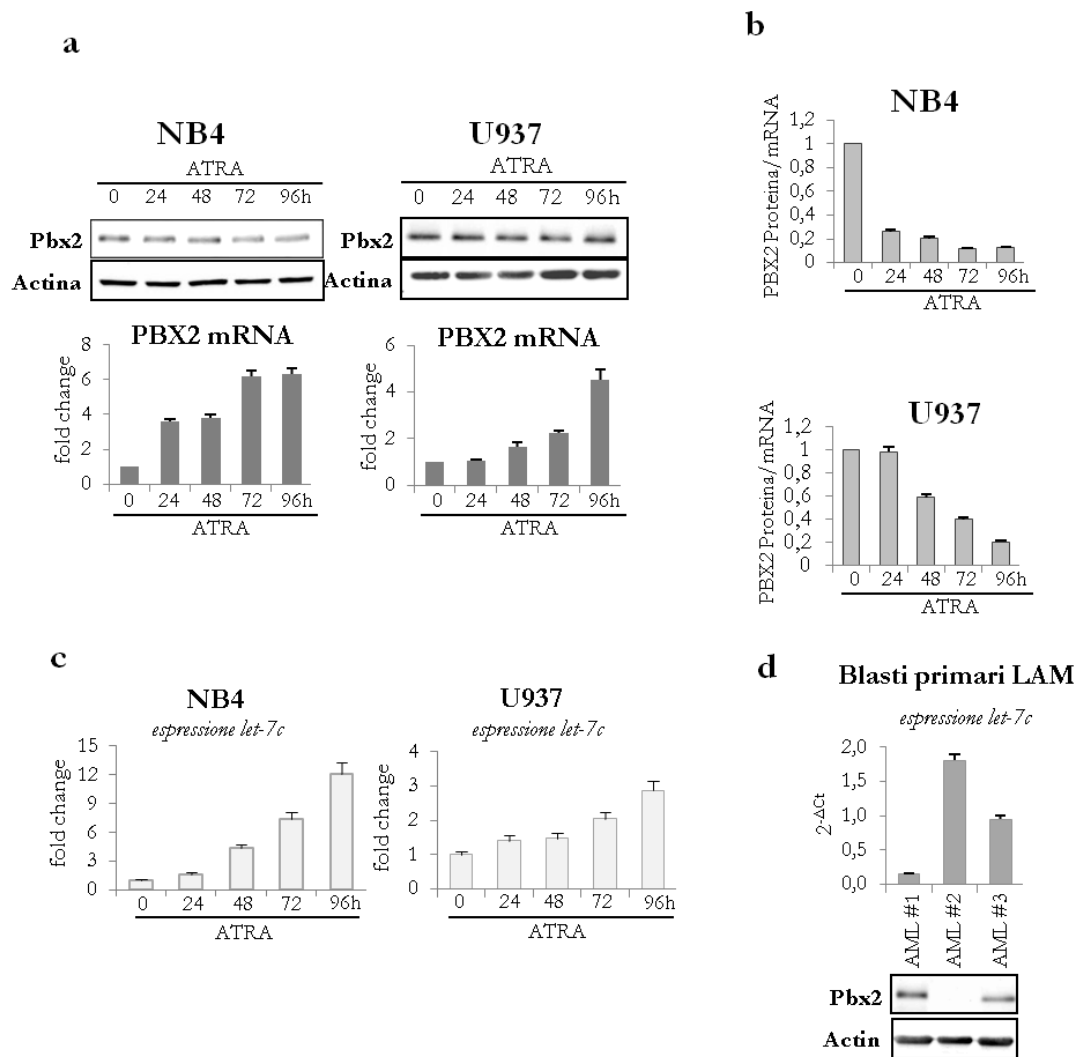


Figura 12. Espressione di Pbx2 nel differenziamento indotto da ATRA. a) (pannello superiore) Western Blot per PBX2 in NB4 e U-937 durante il trattamento con ATRA 1 μ M. (pannello inferiore) Quantificazione dell'mRNA di PBX2 in NB4 e U-937 durante il trattamento con ATRA. I livelli di mRNA sono stati misurati per qRT-PCR, e normalizzati sui livelli di mRNA di GAPDH. I valori sono espressi come *fold change* rispetto alle cellule non trattate. Le barre di errore indicano la S.E.M. (n=3); b) Livello della proteina Pbx2 in NB4 e U-937, misurati tramite analisi densitometrica come descritto in Figura 8, e normalizzati sui livelli di mRNA corrispondente. c) Espressione di *let-7c* misurata tramite *stem-loop* qRT-PCR in NB4 e U-937 durante il trattamento con ATRA. I campioni sono stati normalizzati per RNU19. I valori sono riportati con *fold change* rispetto allo scramble. Le barre di errore indicano la S.E.M. (n=3); d) (pannello superiore) Espressione di *let-7c* misurata in blasti primari di LAM. I valori sono riportati come $2^{-\Delta Ct}$. Le barre di errore indicano la S.E.M. (n=3); (pannello inferiore) Western Blot di Pbx2 endogeno in blasti primari di LAM. E' mostrato un esperimento rappresentativo di 3.

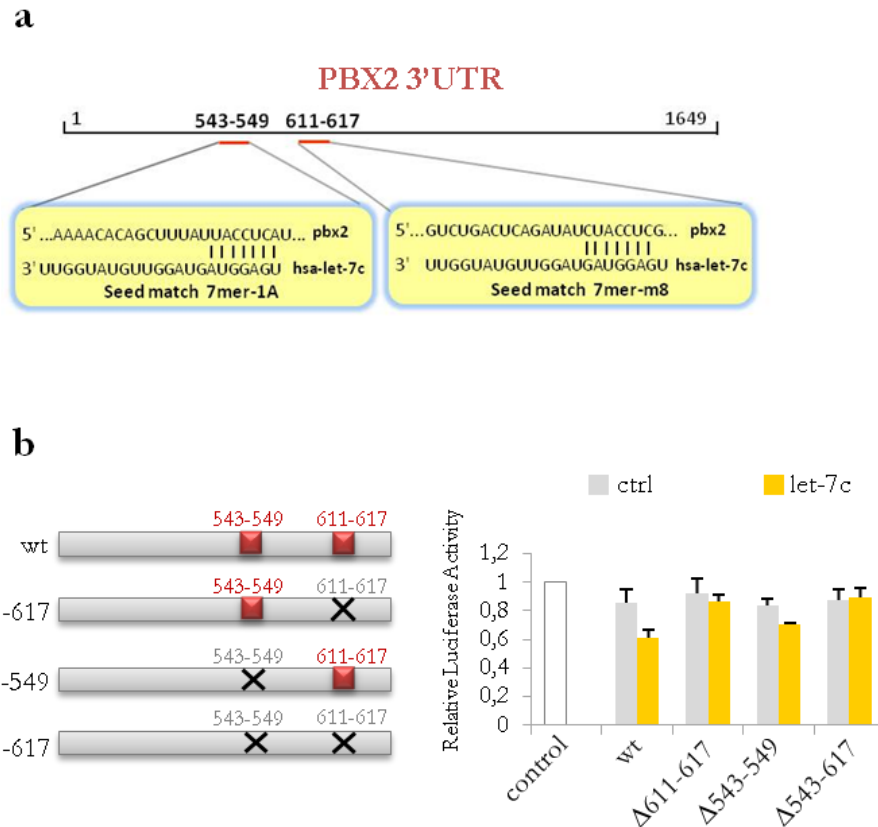


Figura 13. PBX2 è un bersaglio diretto del let-7c. a) Rappresentazione schematica dei putativi siti di legame di let-7c sul 3'UTR di PBX2. In evidenza, l'appaiamento della *seed* del miRNA (analisi realizzata con TargetScan 5.2). b) (pannello di sinistra) Rappresentazione schematica dei costrutti reporter contenenti i siti di legame completi per let-7c (*wt*) e i mutanti per delezione ($\Delta 543-549$; $\Delta 611-617$; $\Delta 543-617$), usati nei saggi di attività luciferasica. (pannello di destra) Saggi di luciferasi sulla linea 293T, trasfettata con i costrutti reporter contenenti il 3'UTR *wt* di Pbx2, o i mutanti per delezione indicati, e con mimic-let-7c o mimic-ctrl. Un plasmide reporter *Renilla* è stato co-trasfettato come controllo interno. L'attività luciferasica è stata misurata a 48 ore dalla trasfezione, e normalizzata sull'attività di *Renilla*. I valori sono riportati come *fold change* rispetto all'attività di luciferasi del vettore vuoto (pGL3 Control). Le barre di errore indicano la S.E.M. (n=3);

Il silenziamento di Pbx2 favorisce il differenziamento in NB4

Per approfondire il ruolo di PBX2 nel differenziamento leucemico, abbiamo verificato se la riduzione nell'espressione di PBX2 sia in grado di mimare l'effetto pro-differenziante indotto dall'espressione ectopica del let-7c. A questo scopo, NB4 sono state trasfettate con uno *small interfering* RNA (siRNA) diretto contro PBX2. Abbiamo confermato la diminuita espressione dell'mRNA e della proteina di PBX2 rispettivamente dopo 24 e 48 ore dalla trasfezione

(**Figura 14a**); quindi, sono stati valutati i livelli di CD11b. I nostri dati mostrano che il knock-down di PBX2 induce un lieve incremento del CD11b rispetto al controllo sia in cellule non trattate che trattate con ATRA (**Figura 14b**). Questi dati suggeriscono che il silenziamento di PBX2 possa favorire il differenziamento mieloide in cellule di LAM.

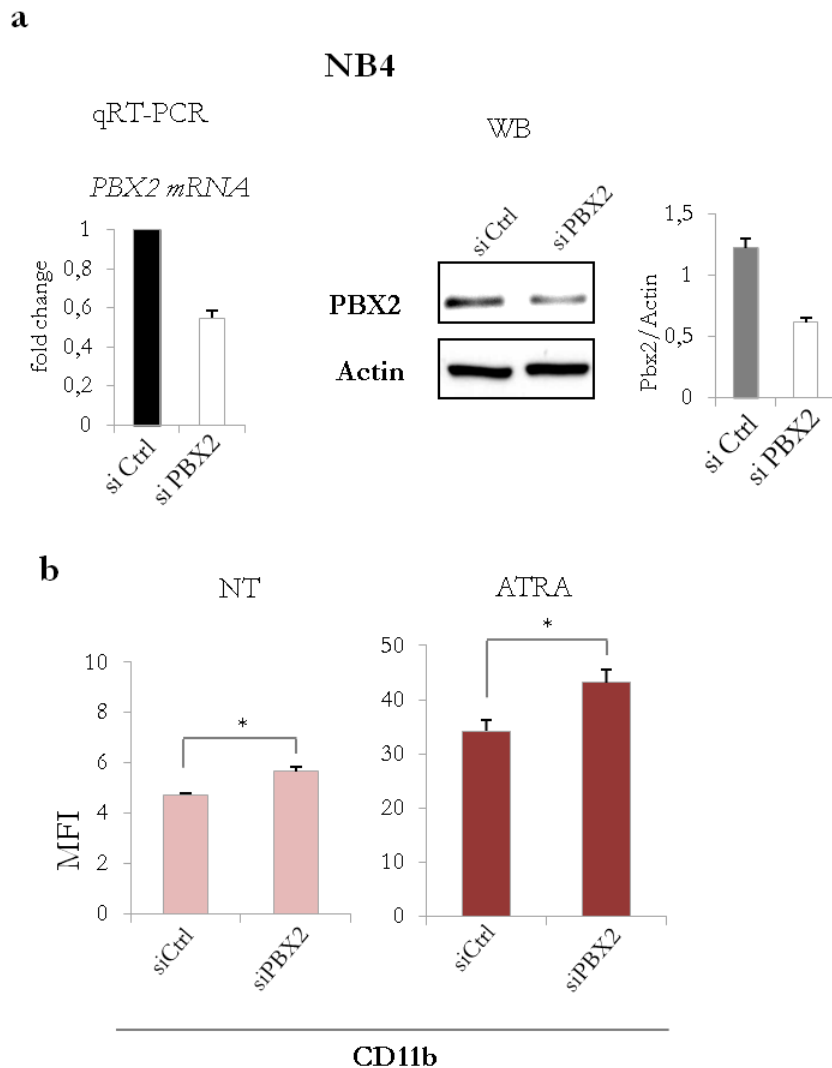


Figura 11. Silenziamento di PBX2 in cellule di LAM. a) (pannello di sinistra) Espressione del trascritto di PBX2 misurata tramite qRT-PCR in NB4 24 ore dopo l'elettroporazione con siRNA per Pbx2 (*siPbx2*) e con un siRNA di controllo (*siCtrl*). I valori sono stati normalizzati per l'espressione di GAPDH, ed espressi come *fold change* rispetto al controllo. (pannello di destra) Western Blot di PBX2 endogeno in NB4 dopo 48 ore dall'elettroporazione con siRNA per PBX2. E' mostrato un esperimento rappresentativo di tre. Sulla destra, media dell'analisi densitometrica di Western Blot per PBX2, realizzata come descritto in legenda della Figura 7. Le barre di errore indicano la S.E.M. (n=3) **b)** Analisi al FACS dell'espressione di CD11b in NB4 non trattate (NT) e trattate con ATRA (ATRA) 72 ore dopo l'elettroporazione con siRNA per PBX2. I valori sono espressi in MFI. Le barre di errore indicano la S.E.M. (n=3). * p value <0.05 (t-student test).

Discussione e Conclusioni

Il let-7c appartiene alla famiglia di miRNA let-7, che ha ruoli importanti nello sviluppo e nel differenziamento cellulare, ed è potenzialmente coinvolta come oncosoppressore in diversi tipi di tumori (Büssing et al, 2008). Recentemente, abbiamo identificato il let-7c come uno dei miRNA la cui espressione è repressa in blasti di LAP alla diagnosi rispetto a promielociti normali differenziati *in vitro* (Careccia et al, 2009). Inoltre, abbiamo dimostrato che, in cellule di LAP, il let-7c è un bersaglio dell'oncoproteina PML/RAR α e, in seguito a trattamento con ATRA, la rimozione di PML/RAR α dal promotore del let-7c è associato ad un aumento di espressione del miRNA (Careccia et al, 2009). Il let-7c è stato trovato ipo-espresso anche nel linfoma di Burkitt e in pazienti di LAM con t(8;21) e inv(16) (Jongen-Lavrencic et al, 2008; Leucci et al, 2008). Questi dati suggerivano il potenziale ruolo di oncosoppressore del let-7c anche nelle leucemie. Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato lo studio della funzione biologica del let-7c in cellule di LAM. I nostri dati mostrano che l'espressione ectopica del let-7c promuove il differenziamento mieloide sia in linee cellulari di LAM che in blasti primari, e suggeriscono che l'effetto pro-differenziante del let-7c sulle cellule di LAM sia specifico per la linea granulocitaria.

Numerose evidenze attribuiscono un ruolo importante ai miRNA anche nel controllo dell'ematopoiesi normale. Perciò, l'effetto pro-differenziante del let-7c in cellule di LAM ci ha indotto a studiare la possibile implicazione di questo miRNA anche nel normale differenziamento ematopoietico. Sebbene i nostri dati mostrino che l'espressione del let-7c sia modulata nella granulopoiesi normale, il suo silenziamento non altera il differenziamento. Questo potrebbe riflettere una rilevanza diversa del let-7c nel differenziamento normale rispetto a quello patologico. Tuttavia, dovrebbe essere considerato che in questo contesto altri membri della famiglia let-7 potrebbero vicariare la funzione del let-7c. In effetti, abbiamo trovato che let-7a e let-7d hanno "pattern" di espressione molto simili a quello del let-7c durante il normale differenziamento granulocitario (Careccia et al, 2009), suggerendo che possa esistere una ridondanza nelle potenziali funzioni dei miRNA let-7 in questo processo. Difatti, sebbene i miRNA della famiglia let-7 abbiano caratteristici "pattern" di espressione temporali durante lo sviluppo, un ruolo diretto di questi miRNA nello sviluppo dei vertebrati non è stato ad oggi chiaramente dimostrato, probabilmente a causa della possibile ridondanza dei membri di una famiglia così numerosa (Roush e Slack, 2008).

Alcuni studi hanno evidenziato che i miRNA della famiglia let-7 possono giocare un ruolo importante anche nel controllo del ciclo cellulare sia in tessuti normali che tumorali, e alcuni bersagli molecolari noti di questa famiglia sono fattori che regolano la proliferazione cellulare (vedi *Capitolo 3.4 La famiglia di microRNA let-7* e Büssing et al, 2008). Tuttavia, i risultati da noi ottenuti mostrano che in un contesto leucemico l'iper-espressione del let-7c non ha effetto sulla proliferazione cellulare. Questo suggerisce una funzione del let-7 strettamente dipendente dal contesto cellulare. Quindi, gli effetti del let-7c in cellule di LAM possono essere rilevanti nell'attivare alcuni programmi del differenziamento granulocitario, ma non sufficienti ad alterare il ciclo cellulare. Inoltre, sebbene i fattori che promuovono la maturazione emopoietica possano esercitare la loro funzione anche inibendo il ciclo cellulare, nell'ematopoiesi l'inibizione della proliferazione e l'induzione al differenziamento non sono sempre processi correlati (vedi *Capitolo 1.3 Meccanismi molecolari del differenziamento ematopoietico* e Schuster et al, 2003).

Considerato l'effetto pro-differenziante del let-7c in cellule di LAM, abbiamo quindi studiato i possibili meccanismi molecolari attraverso i quali il miRNA può esercitare questo effetto. A tale scopo, abbiamo cercato i potenziali bersagli molecolari del let-7c nelle LAM. Numerosi bersagli della famiglia let-7 sono già stati identificati (Ras, Myc e HMGA2 e molti geni del ciclo cellulare), e alcuni di questi hanno ruoli importanti nella tumorigenesi (Johnson et al, 2005 Cell; Mayr et al, 2007; Leucci et al, 2008). Ciò nonostante, ad oggi bersagli del let-7c che possono contribuire specificamente alla patogenesi delle LAM non sono stati ancora validati sperimentalmente. Lo screening di putativi bersagli del let-7c mediante differenti algoritmi (vedi *Materiali e Metodi*), ha permesso l'individuazione di una pletera di potenziali bersagli per il let-7c. Fra questi, abbiamo focalizzato la nostra attenzione su PBX2 e PBX3 per il loro coinvolgimento nelle leucemie (Laurent et al, 2008). I fattori Pbx appartengono al gruppo delle proteine *Three Aminoacid Loop Extension* (TALE), superfamiglia di fattori di trascrizione che possono formare complessi eteromerici con le proteine Hox (Shen et al, 1999; Schnabel et al, 2000), e numerosi studi suggeriscono un loro ruolo nei processi differenziativi, sia nell'ematopoiesi normale che patologica (Di Martino et al, 1998; Schnabel et al, 2000; Wong et al, 2007; Pillay et al, 2010). I nostri dati mostrano che PBX2, ma non PBX3, è un nuovo bersaglio diretto di let-7c. Nelle linee leucemiche studiate, abbiamo osservato che il differenziamento indotto da ATRA aumenta i livelli dell'mRNA di Pbx2, mentre i livelli della proteina non subiscono variazioni significative. Da un lato, questi dati suggeriscono che l'ATRA possa attivare la trascrizione di Pbx2 in cellule leucemiche, in accordo con alcuni studi, nei quali l'ATRA modula positivamente l'espressione dei fattori PBX in cellule di

carcinoma embrionale murino (Qin et al, 2002; Qin et al, 2004). D'altra parte, è interessante osservare che, quando i livelli della proteina di PBX2 vengono normalizzati con quelli dell'mRNA, il rapporto proteina/mRNA risulta fortemente diminuito dopo trattamento con ATRA. Questa discrepanza fra i livelli di espressione di proteina e mRNA suggeriscono che meccanismi regolatori post-trascrizionali, come un'alterata capacità del trascritto di essere tradotto in proteina, siano implicati nella regolazione dell'espressione di PBX2 in seguito al trattamento con ATRA. Questi meccanismi sono tipicamente associati alla regolazione dei miRNA, e sono già stati descritti nel differenziamento ematopoietico (Felli et al, 2005). L'incremento del let-7c in cellule leucemiche trattate con ATRA suggerisce che la regolazione post-trascrizionale di PBX2 sia mediata, almeno in parte, da questo miRNA. Inoltre, abbiamo trovato una correlazione inversa tra l'espressione di let-7c e la proteina PBX2 in 3 campioni di pazienti di LAM, suggerendo che questo fattore possa rappresentare un bersaglio molecolare del let-7c anche *in vivo* nelle LAM.

Infine, per verificare se la repressione di PBX2 partecipi al differenziamento leucemico, abbiamo interferito PBX2 in cellule di LAM. Il knock-down di PBX2 induce un aumento del marcatore del differenziamento mieloide CD11b, indicando un potenziale coinvolgimento di PBX2 nel differenziamento mieloide. Tuttavia, l'effetto misurato è modesto, e non ricapitola completamente l'induzione del differenziamento esplicita dal let-7c. Questo potrebbe dipendere dalla ben nota ridotta efficienza di trasfezione delle cellule leucemiche, che non consente un buon "knock-out" di PBX2. D'altra parte, è anche verosimile che l'effetto pro-differenziante di let-7c non passi attraverso la sola regolazione negativa di PBX2. La soppressione di altri bersagli, oltre PBX2, potrebbe rappresentare una parte importante dei meccanismi molecolari attraverso i quali il let-7c induce differenziamento nelle LAM.

In conclusione, questo studio mostra che il let-7c promuove il differenziamento granulocitario nelle LAM, ed abbiamo identificato e validato sperimentalmente PBX2 come un nuovo bersaglio diretto di let-7c in cellule mieloidi. Poichè PBX2 regola processi biologici normali e patologici attraverso la formazione di complessi con Meis1 e HoxA9 (Shen et al, 1999; Schnabel et al, 2000), sarebbe interessante verificare se sotto-gruppi di geni regolati da HoxA9 siano modulati anche a seguito di una perturbazione nell'espressione di let-7c. Considerato inoltre che l'espressione di Meis1-HoxA9 è richiesta per la leuchemiogenesi MLL-dipendente (Wong et al, 2007), si potrebbe valutare se l'iper-espressione del let-7c possa anche sopprimere la proliferazione di cellule leucemiche esprimenti proteine chimeriche MLL.

Questi dati suggeriscono che la repressione del let-7c possa rappresentare un evento molecolare particolarmente importante nella leuchemiogenesi, almeno in certi tipi di leucemie.

Inoltre, potrebbe essere interessante testare se questo miRNA possa avere un'utilità come agente terapeutico. Il potenziale impiego dei miRNA let-7 come agenti terapeutici nei tumori è già stato proposto per i carcinomi polmonari, dove let-7 può avere un ruolo rilevante come oncosoppressore. In modelli murini di tumore al polmone indotto da K-Ras, l'espressione ectopica di let-7a o di let-7f, indotta tramite sistemi virali, è risultata in una significativa riduzione nella formazione dei tumori (Esquela-Kerscher et al, 2008; Kumar et al, 2008).

La LAM non è una singola malattia, ma un gruppo eterogeneo di disordini neoplastici, con una notevole variabilità nella risposta ai trattamenti. Queste caratteristiche rappresentano una significativa barriera verso un'accurata classificazione clinica, una stratificazione del rischio, e una terapia mirata. Infatti, sebbene sia il tipo di leucemia più comune negli adulti, la LAM continua ad avere il più basso tasso di sopravvivenza di tutte le leucemie. Perciò, la caratterizzazione di nuovi meccanismi molecolari, che possono condurre all'identificazione di bersagli comuni nelle terapie anti-leucemiche, potrebbe superare l'enorme eterogeneità molecolare delle LAM, migliorando enormemente la comprensione della patogenesi e l'accuratezza della prognosi. In questo scenario, il presente studio potrebbe contribuire ad una migliore comprensione dei "pathways" coinvolti nella transizione dal differenziamento mieloido normale al patologico, e all'identificazione di nuovi bersagli per lo sviluppo di specifiche terapie per le leucemie mieloidi acute.

Bibliografia

- Abramovich C, Shen WF, Pineault N, Imren S, Montpetit B, Largman C *et al* (2000). Functional cloning and characterization of a novel nonhomeodomain protein that inhibits the binding of PBX1-HOX complexes to DNA. *J Biol Chem* **275**: 26172-26177.
- Ambros V (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature* **431**: 350-355.
- Anderson KL, Smith KA, Perkin H, Hermanson G, Anderson CG, Jolly DJ *et al* (1999). PU.1 and the granulocyte- and macrophage colony-stimulating factor receptors play distinct roles in late-stage myeloid cell differentiation. *Blood* **94**: 2310-2318.
- Argiropoulos B, Humphries RK (2007). Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis. *Oncogene* **26**: 6766-6776.
- Arnould C, Philippe C, Bourdon V, Gr goire MJ, Berger R, Jonveaux P (1999). The signal transducer and activator of transcription STAT5b gene is a new partner of retinoic acid receptor alpha in acute promyelocytic-like leukaemia. *Hum Mol Genet* **8**: 1741-1749.
- Barroga CF, Pham H, Kaushansky K (2008). Thrombopoietin regulates c-Myb expression by modulating micro RNA 150 expression. *Exp Hematol* **36**: 1585-1592.
- Bartel DP (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**: 215-233.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR *et al* (1985). Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* **103**: 620-625.
- Berezikov E, Chung WJ, Willis J, Cuppen E, Lai EC (2007). Mammalian mirtron genes. *Mol Cell* **28**: 328-336.
- Bhatia M, Kirkland JB, Meckling-Gill KA (1996). Overexpression of poly(ADP-ribose) polymerase promotes cell cycle arrest and inhibits neutrophilic differentiation of NB4 acute promyelocytic leukemia cells. *Cell Growth Differ* **7**: 91-100.
- Blagoev B, Kratchmarova I, Ong SE, Nielsen M, Foster LJ, Mann M (2003). A proteomics strategy to elucidate functional protein-protein interactions applied to EGF signaling. *Nat Biotechnol* **21**: 315-318.
- Borchert GM, Lanier W, Davidson BL (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 1097-1101.
- Boyerinas B, Park SM, Shomron N, Hedegaard MM, Vinther J, Andersen JS *et al* (2008). Identification of let-7-regulated oncofetal genes. *Cancer Res* **68**: 2587-2591.
- Brown D, Kogan S, Lagasse E, Weissman I, Alcalay M, Pelicci PG *et al* (1997). A PMLRARalpha transgene initiates murine acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 2551-2556.

- Brown G, Drayson MT, Durham J, Toellner KM, Hughes PJ, Choudhry MA *et al* (2002). HL60 cells halted in G1 or S phase differentiate normally. *Exp Cell Res* **281**: 28-38.
- Bussing I, Slack FJ, Grosshans H (2008). let-7 microRNAs in development, stem cells and cancer. *Trends Mol Med* **14**: 400-409.
- Byrd JC, Mrozek K, Dodge RK, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC *et al* (2002). Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood* **100**: 4325-4336.
- Caligiuri MA, Briesewitz R, Yu J, Wang L, Wei M, Arnoczky KJ *et al* (2007). Novel c-CBL and CBL-b ubiquitin ligase mutations in human acute myeloid leukemia. *Blood* **110**: 1022-1024.
- Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E *et al* (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 15524-15529.
- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S *et al* (2004). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 2999-3004.
- Calin GA, Croce CM (2006). MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* **6**: 857-866.
- Careccia S, Mainardi S, Pelosi A, Gurtner A, Diverio D, Riccioni R *et al* (2009). A restricted signature of miRNAs distinguishes APL blasts from normal promyelocytes. *Oncogene* **28**: 4034-4040.
- Carracedo A, Ito K, Pandolfi PP (2011). The nuclear bodies inside out: PML conquers the cytoplasm. *Curr Opin Cell Biol* **23**: 360-366.
- Caygill EE, Johnston LA (2008). Temporal regulation of metamorphic processes in Drosophila by the let-7 and miR-125 heterochronic microRNAs. *Curr Biol* **18**: 943-950.
- Chang TC, Mendell JT (2007). microRNAs in vertebrate physiology and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **8**: 215-239.
- Chang TC, Yu D, Lee YS, Wentzel EA, Arking DE, West KM *et al* (2008). Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat Genet* **40**: 43-50.
- Chen Z, Brand NJ, Chen A, Chen SJ, Tong JH, Wang ZY *et al* (1993). Fusion between a novel Kruppel-like zinc finger gene and the retinoic acid receptor-alpha locus due to a variant t(11;17) translocation associated with acute promyelocytic leukaemia. *EMBO J* **12**: 1161-1167.
- Chen H, Ray-Gallet D, Zhang P, Hetherington CJ, Gonzalez DA, Zhang DE *et al* (1995). PU.1 (Spi-1) autoregulates its expression in myeloid cells. *Oncogene* **11**: 1549-1560.
- Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP (2004). MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* **303**: 83-86.

- Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT *et al* (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **33**: e179.
- Cheng GX, Zhu XH, Men XQ, Wang L, Huang QH, Jin XL *et al* (1999). Distinct leukemia phenotypes in transgenic mice and different corepressor interactions generated by promyelocytic leukemia variant fusion genes PLZF-RARalpha and NPM-RARalpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 6318-6323.
- Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M *et al* (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 13944-13949.
- de la Serna IL, Ohkawa Y, Berkes CA, Bergstrom DA, Dacwag CS, Tapscott SJ *et al* (2005). MyoD targets chromatin remodeling complexes to the myogenin locus prior to forming a stable DNA-bound complex. *Mol Cell Biol* **25**: 3997-4009.
- Denti MA, Rosa A, Sthandier O, De Angelis FG, Bozzoni I (2004). A new vector, based on the PolIII promoter of the U1 snRNA gene, for the expression of siRNAs in mammalian cells. *Mol Ther* **10**: 191-199.
- Di Croce L, Raker VA, Corsaro M, Fazi F, Fanelli M, Faretta M *et al* (2002). Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science* **295**: 1079-1082.
- DiMartino JF, Selleri L, Traver D, Firpo MT, Rhee J, Warnke R *et al* (2001). The Hox cofactor and proto-oncogene Pbx1 is required for maintenance of definitive hematopoiesis in the fetal liver. *Blood* **98**: 618-626.
- Döhner H (2007). Implication of the molecular characterization of acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 412-419.
- Drexler HG (1996). Expression of FLT3 receptor and response to FLT3 ligand by leukemic cells. *Leukemia* **10**: 588-599.
- Eguchi M, Eguchi-Ishimae M, Greaves M (2005). Molecular pathogenesis of MLL-associated leukemias. *Int J Hematol* **82**: 9-20.
- Elghetany MT (2002). Surface antigen changes during normal neutrophilic development: a critical review. *Blood Cells Mol Dis* **28**: 260-274.
- Enright AJ, John B, Gaul U, Tuschl T, Sander C, Marks DS (2003). MicroRNA targets in Drosophila. *Genome Biol* **5**: R1.
- Esquela-Kerscher A, Johnson SM, Bai L, Saito K, Partridge J, Reinert KL *et al* (2005). Post-embryonic expression of C. elegans microRNAs belonging to the lin-4 and let-7 families in the hypodermis and the reproductive system. *Dev Dyn* **234**: 868-877.
- Esquela-Kerscher A, Trang P, Wiggins JF, Patrawala L, Cheng A, Ford L *et al* (2008). The let-7 microRNA reduces tumor growth in mouse models of lung cancer. *Cell Cycle* **7**: 759-764.

- Estey E, Dohner H (2006). Acute myeloid leukaemia. *Lancet* **368**: 1894-1907.
- Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L *et al* (2005). Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med* **352**: 254-266.
- Fazi F, Rosa A, Fatica A, Gelmetti V, De Marchis ML, Nervi C *et al* (2005). A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis. *Cell* **123**: 819-831.
- Fazi F, Racanicchi S, Zardo G, Starnes LM, Mancini M, Travaglini L *et al* (2007). Epigenetic silencing of the myelopoiesis regulator microRNA-223 by the AML1/ETO oncoprotein. *Cancer Cell* **12**: 457-466.
- Felli N, Fontana L, Pelosi E, Botta R, Bonci D, Facchiano F *et al* (2005). MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 18081-18086.
- Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* **9**: 102-114.
- Fontana L, Pelosi E, Greco P, Racanicchi S, Testa U, Liuzzi F *et al* (2007). MicroRNAs 17-5p-20a-106a control monocytopenia through AML1 targeting and M-CSF receptor upregulation. *Nat Cell Biol* **9**: 775-787.
- Garzon R, Pichiorri F, Palumbo T, Visentini M, Aqeilan R, Cimmino A *et al* (2007). MicroRNA gene expression during retinoic acid-induced differentiation of human acute promyelocytic leukemia. *Oncogene* **26**: 4148-4157.
- Garzon R, Garofalo M, Martelli MP, Briesewitz R, Wang L, Fernandez-Cymering C *et al* (2008a). Distinctive microRNA signature of acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic mutated nucleophosmin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 3945-3950.
- Garzon R, Volinia S, Liu CG, Fernandez-Cymering C, Palumbo T, Pichiorri F *et al* (2008b). MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood* **111**: 3183-3189.
- Georgantas RW, 3rd, Hildreth R, Morisot S, Alder J, Liu CG, Heimfeld S *et al* (2007). CD34+ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 2750-2755.
- Gough SM, Slape CI, Aplan PD (2011). NUP98 gene fusions and hematopoietic malignancies: common themes and new biologic insights. *Blood* **118**: 6247-6257.
- Griffiths-Jones S (2007). Annotating noncoding RNA genes. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **8**: 279-298.
- Grignani F, De Matteis S, Nervi C, Tomassoni L, Gelmetti V, Cioce M *et al* (1998). Fusion proteins of the retinoic acid receptor-alpha recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia. *Nature* **391**: 815-818.

- Grisendi S, Mecucci C, Falini B, Pandolfi PP (2006). Nucleophosmin and cancer. *Nat Rev Cancer* **6**: 493-505.
- Grisolano JL, Wesselschmidt RL, Pelicci PG, Ley TJ (1997). Altered myeloid development and acute leukemia in transgenic mice expressing PML-RAR alpha under control of cathepsin G regulatory sequences. *Blood* **89**: 376-387.
- Guled M, Lahti L, Lindholm PM, Salmenkivi K, Bagwan I, Nicholson AG *et al* (2009). CDKN2A, NF2, and JUN are dysregulated among other genes by miRNAs in malignant mesothelioma -A miRNA microarray analysis. *Genes Chromosomes Cancer* **48**: 615-623.
- Guo Y, Chen Y, Ito H, Watanabe A, Ge X, Kodama T *et al* (2006). Identification and characterization of lin-28 homolog B (LIN28B) in human hepatocellular carcinoma. *Gene* **384**: 51-61.
- Gurrieri C, Capodieci P, Bernardi R, Scaglioni PP, Nafa K, Rush LJ *et al* (2004). Loss of the tumor suppressor PML in human cancers of multiple histologic origins. *J Natl Cancer Inst* **96**: 269-279.
- Havelange V, Garzon R (2010). MicroRNAs: emerging key regulators of hematopoiesis. *Am J Hematol* **85**: 935-942.
- He LZ, Bhaumik M, Tribioli C, Rego EM, Ivins S, Zelent A *et al* (2000). Two critical hits for promyelocytic leukemia. *Mol Cell* **6**: 1131-1141.
- Hofacker IL (2003). Vienna RNA secondary structure server. *Nucleic Acids Res* **31**: 3429-3431.
- Hohaus S, Petrovick MS, Voso MT, Sun Z, Zhang DE, Tenen DG (1995). PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate expression of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha gene. *Mol Cell Biol* **15**: 5830-5845.
- Hu J (2011). Arsenic in the treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: current status and future research direction. *Front Med* **5**: 45-52.
- Ibarra I, Erlich Y, Muthuswamy SK, Sachidanandam R, Hannon GJ (2007). A role for microRNAs in maintenance of mouse mammary epithelial progenitor cells. *Genes Dev* **21**: 3238-3243.
- Ihle JN (2001). The Stat family in cytokine signaling. *Curr Opin Cell Biol* **13**: 211-217.
- Insinga A, Pelicci PG, Inucci S (2005). Leukemia-associated fusion proteins. Multiple mechanisms of action to drive cell transformation. *Cell Cycle* **4**: 67-69.
- Isken F, Steffen B, Merk S, Dugas M, Markus B, Tidow N *et al* (2008). Identification of acute myeloid leukaemia associated microRNA expression patterns. *Br J Haematol* **140**: 153-161.
- Iwama A, Zhang P, Darlington GJ, McKercher SR, Maki R, Tenen DG (1998). Use of RDA analysis of knockout mice to identify myeloid genes regulated in vivo by PU.1 and C/EBPalpha. *Nucleic Acids Res* **26**: 3034-3043.

- Jiang Q, Wang Y, Hao Y, Juan L, Teng M, Zhang X *et al* (2009). miR2Disease: a manually curated database for microRNA deregulation in human disease. *Nucleic Acids Res* **37**: D98-104.
- Johnson SM, Lin SY, Slack FJ (2003). The time of appearance of the *C. elegans* let-7 microRNA is transcriptionally controlled utilizing a temporal regulatory element in its promoter. *Dev Biol* **259**: 364-379.
- Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A *et al* (2005). RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* **120**: 635-647.
- Johnson CD, Esquela-Kerscher A, Stefani G, Byrom M, Kelnar K, Ovcharenko D *et al* (2007). The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. *Cancer Res* **67**: 7713-7722.
- Jongen-Lavrencic M, Sun SM, Dijkstra MK, Valk PJ, Lowenberg B (2008). MicroRNA expression profiling in relation to the genetic heterogeneity of acute myeloid leukemia. *Blood* **111**: 5078-5085.
- Kainz B, Heintel D, Marculescu R, Schwarzingen I, Sperr W, Le T *et al* (2002). Variable prognostic value of FLT3 internal tandem duplications in patients with de novo AML and a normal karyotype, t(15;17), t(8;21) or inv(16). *Hematol J* **3**: 283-289.
- Kamps MP, Murre C, Sun XH, Baltimore D (1990). A new homeobox gene contributes the DNA binding domain of the t(1;19) translocation protein in pre-B ALL. *Cell* **60**: 547-555.
- Kertesz M, Iovino N, Unnerstall U, Gaul U, Segal E (2007). The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat Genet* **39**: 1278-1284.
- Kim SK, Nam JW, Rhee JK, Lee WJ, Zhang BT (2006). miTarget: microRNA target gene prediction using a support vector machine. *BMC Bioinformatics* **7**: 411.
- King-Underwood L, Pritchard-Jones K (1998). Wilms' tumor (WT1) gene mutations occur mainly in acute myeloid leukemia and may confer drug resistance. *Blood* **91**: 2961-2968.
- Kitchens RL (2000). Role of CD14 in cellular recognition of bacterial lipopolysaccharides. *Chem Immunol* **74**: 61-82.
- Knoepfler PS, Sykes DB, Pasillas M, Kamps MP (2001). HoxB8 requires its Pbx-interaction motif to block differentiation of primary myeloid progenitors and of most cell line models of myeloid differentiation. *Oncogene* **20**: 5440-5448.
- Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, Harrison G, Langabeer SE, Belton AA *et al* (2001). The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood* **98**: 1752-1759.
- Krek A, Grun D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ *et al* (2005). Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* **37**: 495-500.

- Krivtsov AV, Armstrong SA (2007). MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat Rev Cancer* **7**: 823-833.
- Kroon E, Kros J, Thorsteinsdottir U, Baban S, Buchberg AM, Sauvageau G (1998). Hoxa9 transforms primary bone marrow cells through specific collaboration with Meis1a but not Pbx1b. *EMBO J* **17**: 3714-3725.
- Kumar MS, Erkeland SJ, Pester RE, Chen CY, Ebert MS, Sharp PA *et al* (2008). Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 microRNA family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 3903-3908.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T (2002). Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* **12**: 735-739.
- Landthaler M, Yalcin A, Tuschl T (2004). The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and Its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr Biol* **14**: 2162-2167.
- Laurent A, Bihan R, Omilli F, Deschamps S, Pellerin I (2008). PBX proteins: much more than Hox cofactors. *Int J Dev Biol* **52**: 9-20.
- Lawrence HJ, Rozenfeld S, Cruz C, Matsukuma K, Kwong A, Komuves L *et al* (1999). Frequent co-expression of the HOXA9 and MEIS1 homeobox genes in human myeloid leukemias. *Leukemia* **13**: 1993-1999.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993). The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* **75**: 843-854.
- Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* **21**: 4663-4670.
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J *et al* (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**: 415-419.
- Lee YS, Dutta A (2007). The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes Dev* **21**: 1025-1030.
- Leucci E, Cocco M, Onnis A, De Falco G, van Cleef P, Bellan C *et al* (2008). MYC translocation-negative classical Burkitt lymphoma cases: an alternative pathogenetic mechanism involving miRNA deregulation. *J Pathol* **216**: 440-450.
- Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB (2003). Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* **115**: 787-798.
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* **120**: 15-20.
- Licht JD, Chomienne C, Goy A, Chen A, Scott AA, Head DR *et al* (1995). Clinical and molecular characterization of a rare syndrome of acute promyelocytic leukemia associated

with translocation (11;17). *Blood* **85**: 1083-1094.

Licht JD (2006). Reconstructing a disease: What essential features of the retinoic acid receptor fusion oncoproteins generate acute promyelocytic leukemia? *Cancer Cell* **9**: 73-74.

Lowenberg B, Downing JR, Burnett A (1999). Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* **341**: 1051-1062.

Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science* **303**: 95-98.

Lutterbach B, Hou Y, Durst KL, Hiebert SW (1999). The inv(16) encodes an acute myeloid leukemia 1 transcriptional corepressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 12822-12827.

Maragkakis M, Reczko M, Simossis VA, Alexiou P, Papadopoulos GL, Dalamagas T *et al* (2009). DIANA-microT web server: elucidating microRNA functions through target prediction. *Nucleic Acids Res* **37**: W273-276.

Maroney PA, Yu Y, Fisher J, Nilsen TW (2006). Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 1102-1107.

Martens JH, Brinkman AB, Simmer F, Francoijs KJ, Nebbioso A, Ferrara F *et al* (2010). PML-RARalpha/RXR Alters the Epigenetic Landscape in Acute Promyelocytic Leukemia. *Cancer Cell* **17**: 173-185.

Martens JH, Stunnenberg HG (2010). The molecular signature of oncofusion proteins in acute myeloid leukemia. *FEBS Lett* **584**: 2662-2669.

Mayr C, Hemann MT, Bartel DP (2007). Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science* **315**: 1576-1579.

Mead AJ, Linch DC, Hills RK, Wheatley K, Burnett AK, Gale RE (2007). FLT3 tyrosine kinase domain mutations are biologically distinct from and have a significantly more favorable prognosis than FLT3 internal tandem duplications in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* **110**: 1262-1270.

Megraw M, Sethupathy P, Corda B, Hatzigeorgiou AG (2007). miRGen: a database for the study of animal microRNA genomic organization and function. *Nucleic Acids Res* **35**: D149-155.

Meister G, Tuschl T (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* **431**: 343-349.

Melnick A, Licht JD (1999). Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood* **93**: 3167-3215.

Meuret G (1974). Human monocytopoiesis. *Exp Hematol* **2**: 238-249.

Mi S, Lu J, Sun M, Li Z, Zhang H, Neilly MB *et al* (2007). MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia. *Proc Natl*

Acad Sci U S A **104**: 19971-19976.

Milech N, Kees UR, Watt PM (2001). Novel alternative PBX3 isoforms in leukemia cells with distinct interaction specificities. *Genes Chromosomes Cancer* **32**: 275-280.

Mineno J, Okamoto S, Ando T, Sato M, Chono H, Izu H *et al* (2006). The expression profile of microRNAs in mouse embryos. *Nucleic Acids Res* **34**: 1765-1771.

Mitelman F, Johansson B, Mertens F (2007). The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat Rev Cancer* **7**: 233-245.

Moens CB, Selleri L (2006). Hox cofactors in vertebrate development. *Dev Biol* **291**: 193-206.

Monica K, Galili N, Nourse J, Saltman D, Cleary ML (1991). PBX2 and PBX3, new homeobox genes with extensive homology to the human proto-oncogene PBX1. *Mol Cell Biol* **11**: 6149-6157.

Mrozek K, Dohner H, Bloomfield CD (2007). Influence of new molecular prognostic markers in patients with karyotypically normal acute myeloid leukemia: recent advances. *Curr Opin Hematol* **14**: 106-114.

Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K *et al* (1996). Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **10**: 1911-1918.

Nerlov C, Querfurth E, Kulesa H, Graf T (2000). GATA-1 interacts with the myeloid PU.1 transcription factor and represses PU.1-dependent transcription. *Blood* **95**: 2543-2551.

Nervi C, Ferrara FF, Fanelli M, Rippo MR, Tomassini B, Ferrucci PF *et al* (1998). Caspases mediate retinoic acid-induced degradation of the acute promyelocytic leukemia PML/RARalpha fusion protein. *Blood* **92**: 2244-2251.

Nervi C, Fazi F, Grignani F (2008). Oncoproteins, heterochromatin silencing and microRNAs: a new link for leukemogenesis. *Epigenetics* **3**: 1-4.

Neuteboom ST, Murre C (1997). Pbx raises the DNA binding specificity but not the selectivity of antenapedia Hox proteins. *Mol Cell Biol* **17**: 4696-4706.

Newman MA, Thomson JM, Hammond SM (2008). Lin-28 interaction with the Let-7 precursor loop mediates regulated microRNA processing. *RNA* **14**: 1539-1549.

Noma K, Sugiyama T, Cam H, Verdel A, Zofall M, Jia S *et al* (2004). RITS acts in cis to promote RNA interference-mediated transcriptional and post-transcriptional silencing. *Nat Genet* **36**: 1174-1180.

Nottrott S, Simard MJ, Richter JD (2006). Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 1108-1114.

Nourse J, Mellentin JD, Galili N, Wilkinson J, Stanbridge E, Smith SD *et al* (1990). Chromosomal translocation t(1;19) results in synthesis of a homeobox fusion mRNA that codes for a potential chimeric transcription factor. *Cell* **60**: 535-545.

O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Boldin MP, Taganov KD, Nicoll J *et al* (2008). Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder. *J Exp Med* **205**: 585-594.

Orkin SH (2000). Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev Genet* **1**: 57-64.

Ozen M, Creighton CJ, Ozdemir M, Ittmann M (2008). Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer. *Oncogene* **27**: 1788-1793.

Papadopoulos GL, Reczko M, Simossis VA, Sethupathy P, Hatzigeorgiou AG (2009). The database of experimentally supported targets: a functional update of TarBase. *Nucleic Acids Res* **37**: D155-158.

Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B *et al* (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* **408**: 86-89.

Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T, Cougot N, Basyuk E *et al* (2005). Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* **309**: 1573-1576.

Pillay LM, Forrester AM, Erickson T, Berman JN, Waskiewicz AJ (2010). The Hox cofactors Meis1 and Pbx act upstream of gata1 to regulate primitive hematopoiesis. *Dev Biol* **340**: 306-317.

Pineau P, Volinia S, McJunkin K, Marchio A, Battiston C, Terris B *et al* (2010). miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 264-269.

Polesskaya A, Cuvellier S, Naguibneva I, Duquet A, Moss EG, Harel-Bellan A (2007). Lin-28 binds IGF-2 mRNA and participates in skeletal myogenesis by increasing translation efficiency. *Genes Dev* **21**: 1125-1138.

Porse BT, Pedersen TA, Xu X, Lindberg B, Wewer UM, Friis-Hansen L *et al* (2001). E2F repression by C/EBPalpha is required for adipogenesis and granulopoiesis in vivo. *Cell* **107**: 247-258.

Qin P, Cimildoro R, Kochhar DM, Soprano KJ, Soprano DR (2002). PBX, MEIS, and IGF-I are potential mediators of retinoic acid-induced proximodistal limb reduction defects. *Teratology* **66**: 224-234.

Qin P, Haberbush JM, Soprano KJ, Soprano DR (2004). Retinoic acid regulates the expression of PBX1, PBX2, and PBX3 in P19 cells both transcriptionally and post-translationally. *J Cell Biochem* **92**: 147-163.

Rana TM (2007). Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 23-36.

Redner RL, Rush EA, Faas S, Rudert WA, Corey SJ (1996). The t(5;17) variant of acute promyelocytic leukemia expresses a nucleophosmin-retinoic acid receptor fusion. *Blood* **87**:

882-886.

Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE *et al* (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **403**: 901-906.

Rekhtman N, Radparvar F, Evans T, Skoultschi AI (1999). Direct interaction of hematopoietic transcription factors PU.1 and GATA-1: functional antagonism in erythroid cells. *Genes Dev* **13**: 1398-1411.

Rhee JW, Arata A, Selleri L, Jacobs Y, Arata S, Onimaru H *et al* (2004). Pbx3 deficiency results in central hypoventilation. *Am J Pathol* **165**: 1343-1350.

Ro S, Park C, Young D, Sanders KM, Yan W (2007). Tissue-dependent paired expression of miRNAs. *Nucleic Acids Res* **35**: 5944-5953.

Rosnet O, Buhring HJ, Marchetto S, Rappold I, Lavagna C, Sainty D *et al* (1996). Human FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells. *Leukemia* **10**: 238-248.

Roush S, Slack FJ (2008). The let-7 family of microRNAs. *Trends Cell Biol* **18**: 505-516.

Saini HK, Enright AJ, Griffiths-Jones S (2008). Annotation of mammalian primary microRNAs. *BMC Genomics* **9**: 564.

Saleh M, Rambaldi I, Yang XJ, Featherstone MS (2000). Cell signaling switches HOX-PBX complexes from repressors to activators of transcription mediated by histone deacetylases and histone acetyltransferases. *Mol Cell Biol* **20**: 8623-8633.

Sampson VB, Rong NH, Han J, Yang Q, Aris V, Soteropoulos P *et al* (2007). MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. *Cancer Res* **67**: 9762-9770.

Schlessinger J (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **103**: 211-225.

Schnabel CA, Jacobs Y, Cleary ML (2000). HoxA9-mediated immortalization of myeloid progenitors requires functional interactions with TALE cofactors Pbx and Meis. *Oncogene* **19**: 608-616.

Schnittger S, Schoch C, Kern W, Mecucci C, Tschulik C, Martelli MF *et al* (2005). Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood* **106**: 3733-3739.

Schultz J, Lorenz P, Gross G, Ibrahim S, Kunz M (2008). MicroRNA let-7b targets important cell cycle molecules in malignant melanoma cells and interferes with anchorage-independent growth. *Cell Res* **18**: 549-557.

Schuster C, Forster K, Dierks H, Elsasser A, Behre G, Simon N *et al* (2003). The effects of Bcr-Abl on C/EBP transcription-factor regulation and neutrophilic differentiation are reversed by the Abl kinase inhibitor imatinib mesylate. *Blood* **101**: 655-663.

- Schwanhaussner B, Gossen M, Dittmar G, Selbach M (2009). Global analysis of cellular protein translation by pulsed SILAC. *Proteomics* **9**: 205-209.
- Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* **115**: 199-208.
- Selbach M, Schwanhaussner B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N (2008). Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* **455**: 58-63.
- Selleri L, Depew MJ, Jacobs Y, Chanda SK, Tsang KY, Cheah KS *et al* (2001). Requirement for Pbx1 in skeletal patterning and programming chondrocyte proliferation and differentiation. *Development* **128**: 3543-3557.
- Selleri L, DiMartino J, van Deursen J, Brendolan A, Sanyal M, Boon E *et al* (2004). The TALE homeodomain protein Pbx2 is not essential for development and long-term survival. *Mol Cell Biol* **24**: 5324-5331.
- Sempere LF, Dubrovsky EB, Dubrovskaya VA, Berger EM, Ambros V (2002). The expression of the let-7 small regulatory RNA is controlled by ecdysone during metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **244**: 170-179.
- Sempere LF, Freemantle S, Pitha-Rowe I, Moss E, Dmitrovsky E, Ambros V (2004). Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol* **5**: R13.
- Sethupathy P, Megraw M, Hatzigeorgiou AG (2006). A guide through present computational approaches for the identification of mammalian microRNA targets. *Nat Methods* **3**: 881-886.
- Shah N, Sukumar S (2010). The Hox genes and their roles in oncogenesis. *Nat Rev Cancer* **10**: 361-371.
- Shell S, Park SM, Radjabi AR, Schickel R, Kistner EO, Jewell DA *et al* (2007). Let-7 expression defines two differentiation stages of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 11400-11405.
- Shen WF, Rozenfeld S, Kwong A, Kom ves LG, Lawrence HJ, Largman C (1999). HOXA9 forms triple complexes with PBX2 and MEIS1 in myeloid cells. *Mol Cell Biol* **19**: 3051-3061.
- Smith LT, Hohaus S, Gonzalez DA, Dziennis SE, Tenen DG (1996). PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate the granulocyte colony-stimulating factor receptor promoter in myeloid cells. *Blood* **88**: 1234-1247.
- Sonkoly E, Wei T, Janson PC, Saaf A, Lundeberg L, Tengvall-Linder M *et al* (2007). MicroRNAs: novel regulators involved in the pathogenesis of psoriasis? *PLoS One* **2**: e610.
- Steffen B, Muller-Tidow C, Schwable J, Berdel WE, Serve H (2005). The molecular pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol* **56**: 195-221.
- Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H *et al* (2004). Reduced

- expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* **64**: 3753-3756.
- Tallman MS, Gilliland DG, Rowe JM (2005). Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood* **106**: 1154-1163.
- Tenen DG (2003). Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nat Rev Cancer* **3**: 89-101.
- Testa U, Fossati C, Samoggia P, Masciulli R, Mariani G, Hassan HJ *et al* (1996). Expression of growth factor receptors in unilineage differentiation culture of purified hematopoietic progenitors. *Blood* **88**: 3391-3406.
- Thiede C, Koch S, Creutzig E, Steudel C, Illmer T, Schaich M *et al* (2006). Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* **107**: 4011-4020.
- Timchenko N, Wilson DR, Taylor LR, Abdelsayed S, Wilde M, Sawadogo M *et al* (1995). Autoregulation of the human C/EBP alpha gene by stimulation of upstream stimulatory factor binding. *Mol Cell Biol* **15**: 1192-1202.
- Timchenko NA, Wilde M, Nakanishi M, Smith JR, Darlington GJ (1996). CCAAT/enhancer-binding protein alpha (C/EBP alpha) inhibits cell proliferation through the p21 (WAF-1/CIP-1/SDI-1) protein. *Genes Dev* **10**: 804-815.
- Viswanathan SR, Daley GQ, Gregory RI (2008). Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science* **320**: 97-100.
- Viswanathan SR, Powers JT, Einhorn W, Hoshida Y, Ng TL, Toffanin S *et al* (2009). Lin28 promotes transformation and is associated with advanced human malignancies. *Nat Genet* **41**: 843-848.
- Viswanathan SR, Daley GQ (2010). Lin28: A microRNA regulator with a macro role. *Cell* **140**: 445-449.
- Wagner K, Mincheva A, Korn B, Lichter P, Popperl H (2001). Pbx4, a new Pbx family member on mouse chromosome 8, is expressed during spermatogenesis. *Mech Dev* **103**: 127-131.
- Wang Q, Stacy T, Binder M, Marin-Padilla M, Sharpe AH, Speck NA (1996). Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 3444-3449.
- Wang H, Iakova P, Wilde M, Welm A, Goode T, Roesler WJ *et al* (2001). C/EBPalpha arrests cell proliferation through direct inhibition of Cdk2 and Cdk4. *Mol Cell* **8**: 817-828.
- Wang X (2008). miRDB: a microRNA target prediction and functional annotation database with a wiki interface. *RNA* **14**: 1012-1017.
- Wells RA, Catzavelos C, Kamel-Reid S (1997). Fusion of retinoic acid receptor alpha to

NuMA, the nuclear mitotic apparatus protein, by a variant translocation in acute promyelocytic leukaemia. *Nat Genet* **17**: 109-113.

Westendorf JJ, Yamamoto CM, Lenny N, Downing JR, Selsted ME, Hiebert SW (1998). The t(8;21) fusion product, AML-1-ETO, associates with C/EBP-alpha, inhibits C/EBP-alpha-dependent transcription, and blocks granulocytic differentiation. *Mol Cell Biol* **18**: 322-333.

Williams TM, Williams ME, Innis JW (2005). Range of HOX/TALE superclass associations and protein domain requirements for HOXA13:MEIS interaction. *Dev Biol* **277**: 457-471.

Wong P, Iwasaki M, Somervaille TC, So CW, Cleary ML (2007). Meis1 is an essential and rate-limiting regulator of MLL leukemia stem cell potential. *Genes Dev* **21**: 2762-2774.

Wu L, Fan J, Belasco JG (2006). MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 4034-4039.

Wulczyn FG, Smirnova L, Rybak A, Brandt C, Kwidzinski E, Ninnemann O *et al* (2007). Post-transcriptional regulation of the let-7 microRNA during neural cell specification. *FASEB J* **21**: 415-426.

Xiao F, Zuo Z, Cai G, Kang S, Gao X, Li T (2009). miRecords: an integrated resource for microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res* **37**: D105-110.

Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S *et al* (2001). Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood* **97**: 2434-2439.

Yassin ER, Sarma NJ, Abdul-Nabi AM, Dombrowski J, Han Y, Takeda A *et al* (2009). Dissection of the transformation of primary human hematopoietic cells by the oncogene NUP98-HOXA9. *PLoS One* **4**: e6719.

Yokoyama A, Lin M, Naresh A, Kitabayashi I, Cleary ML (2010). A higher-order complex containing AF4 and ENL family proteins with P-TFEB facilitates oncogenic and physiologic MLL-dependent transcription. *Cancer Cell* **17**: 198-212.

Yoshida H, Kitamura K, Tanaka K, Omura S, Miyazaki T, Hachiya T *et al* (1996). Accelerated degradation of PML-retinoic acid receptor alpha (PML-RARA) oncoprotein by all-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia: possible role of the proteasome pathway. *Cancer Res* **56**: 2945-2948.

Youn BS, Mantel C, Broxmeyer HE (2000). Chemokines, chemokine receptors and hematopoiesis. *Immunol Rev* **177**: 150-174.

Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S *et al* (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**: 1917-1920.

Zeng Y (2006). Principles of micro-RNA production and maturation. *Oncogene* **25**: 6156-6162.

Zhang DE, Zhang P, Wang ND, Hetherington CJ, Darlington GJ, Tenen DG (1997). Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT

enhancer binding protein alpha-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 569-574.

Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG *et al* (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* **425**: 836-841.

Zimonjic DB, Pollock JL, Westervelt P, Popescu NC, Ley TJ (2000). Acquired, nonrandom chromosomal abnormalities associated with the development of acute promyelocytic leukemia in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 13306-13311.

Zon LI, Youssoufian H, Mather C, Lodish HF, Orkin SH (1991). Activation of the erythropoietin receptor promoter by transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 10638-10641.